

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/061001 A1

(51) 国際特許分類⁷: **A61K 45/00**, 48/00, 31/7088, 41/00, A61P 35/00, 35/02, 35/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019800

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-428300
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パストラル本館 7 階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 利博 (NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒2240001 神奈川県横浜市都筑区中川 1-2 港北ガーデンヒルズ A 棟 503 号 Kanagawa (JP). 山崎 聡士 (YAMASAKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒2250003 神奈川県横浜市青葉区新石川 2-16-7 石川坂マンション 305 号 Kanagawa (JP). 八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko) [JP/JP]; 〒2340053 神奈川県横浜市港南区日野中央 2-39-9 コスモ港南台 507 号 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SUPPRESSING CANCER

(54) 発明の名称: 癌の抑制方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of activating a cancer suppressor gene p53 or a protein p53 and localizing it in nucleus; and a medicinal composition containing a substance promoting the activity of the cancer suppressor gene p53 or the protein p53.

(57) 要約: 本発明は、p53 癌抑制遺伝子または p53 タンパク質を活性化させて核に局在化させることを特徴とする癌の抑制方法、及び p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性を促進する物質を含む医薬組成物を提供する。

WO 2005/061001 A1

明 細 書

癌の抑制方法

5 技術分野

本発明は、p53 癌抑制遺伝子または p53 タンパク質を活性化させて p53 タンパク質を核に局在化させる方法に関する。また、本発明は、p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化を促進する物質を含む医薬組成物に関する。

10

背景技術

シノビオリンは、リウマチ患者由来滑膜細胞で過剰発現している膜タンパク質として発見された新規タンパク質である (WO02/052007)。そして、遺伝子改変動物を用いた研究により、シノビオリンは関節リウマチの発症に必須の分子であることが判明した。

15

タンパク質構造予測システムにより、シノビオリンは RING finger モチーフを有することが示唆されている。このモチーフはタンパク質のユビキチン化に重要な役割を果たす E3 ユビキチンライゲースという酵素に多く見出されているが、実際、シノビオリンが E3 ユビキチンライゲースの特徴のひとつである自己ユビキチン化活性を有することが証明されている (WO02/052007)。

20

ところで、p53 遺伝子は、第 17 染色体 p13 に位置しており、癌細胞の発生及び増殖においてきわめて重要な癌抑制遺伝子である。p53 タンパク質は、DNA 上の特異的塩基配列 [5'-(A/T)GPyPyPy-3'] を認識し、waf1/cip1、GADD45、BAX 等の特定の遺伝子の転写活性化を促す。また、(i)その他の多くの遺伝子の転写を抑制すること、(ii)SV40 ラージ T 抗原、アデノウイルス E1B タンパク質、パピローマウイルス E6 などのウイルス性癌遺伝子、あるいは mdm2 等の細胞性癌遺伝子と結合すること、(iii)ミスマッチを含む DNA と特異的に結合すること等の生理機能が知られている。

25

30

従って、癌の抑制物質を見出すには、p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパ

ク質の機能を制御する分子を解析することが重要である。

発明の開示

5 本発明は、p53 癌抑制遺伝子または p53 タンパク質の活性化を促進する方法、及び p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化を促進する医薬組成物を提供することを目的とする。

10 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。そして、シノビオリンホモノックアウト動物を詳細に解析したところ、野生型に比し、アポトーシスを起こしている細胞が多数観察され、また、アポトーシスの誘導に深く関与している p53 タンパク質が核内に局在し、強く発現していることが判明した。そして、シノビオリンの機能を阻害することにより、p53 癌抑制遺伝子または 53 癌抑制タンパク質が活性化されて癌細胞の増殖が阻止されることを見出し、本発明を完成するに至った。

15 すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) p53 癌抑制遺伝子の活性化又は p53 タンパク質の活性を促進する物質を含む医薬組成物。

20 (2) p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化を促進する物質が、シノビオリンの発現及び/又は機能阻害物質である (1) 記載の医薬組成物。

(3) シノビオリンの発現及び/又は機能阻害物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である (2) 記載の医薬組成物。

25 (4) シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 に示される塩基配列を含むものである (3) 記載の医薬組成物。

(5) siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである (3) 記載の医薬組成物。

30 (6) 癌を治療するための (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

- (7) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化方法。
- (8) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする p53 タンパク質の核への局在化方法。
- 5 (9) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 タンパク質を核に局在化させることを特徴とする癌の抑制方法。
- (10) 核に局在化した p53 タンパク質に、さらに放射線照射又は紫外線照射を行うことを特徴とする請求項 9 記載の方法。
- (11) 核に局在化した p53 タンパク質を含む細胞に、さらに抗癌剤を接
- 10 触させ、又は当該細胞の周囲の脈管に塞栓を施すことを特徴とする請求項 9 記載の方法。
- (12) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、p53 タンパク質のアミノ酸残基の一部をリン酸化する方法。
- (13) アミノ酸残基の一部が、第 15 番目のセリン残基である (12) 記
- 15 載の方法。
- (14) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、リン酸化酵素の活性化方法。
- (15) リン酸化酵素が ATM 若しくは ATR 又はこれらと同様の活性を持つ酵素等である (14) 記載の方法。
- 20 (16) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することにより p53 タンパク質を活性化し、活性化された p53 タンパク質により p21 タンパク質の発現を誘導する方法。
- (17) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 タンパク質に p21 タンパク質の発現を誘導させることを特徴とする癌の抑制方法。
- 25 (18) シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、p53 タンパク質のユビキチン化を阻害する方法。
- (19) シノビオリンの発現阻害が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA によるものである (7) ~ (18) のいずれか 1 項に記載の方法。
- 30 (20) シノビオリンの機能阻害が、シノビオリンの p53 タンパク質への

結合機能阻害である（７）～（１８）のいずれか１項に記載の方法。

（２１）シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号１に示される塩基配列を含むものである（１９）記載の方法。

（２２）siRNA が、配列番号１に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである（１９）記載の方法。

図面の簡単な説明

図１は、シノビオリンホモノックアウトマウス胎仔線維芽細胞(MEFs)における免疫組織染色の結果を示す写真である。

図２は、syno^{-/-}の embryo における抗 p53 抗体による免疫組織染色の結果を示す写真である。

図３は、p53 に関するウェスタンブロッティングの結果を示す写真である。

図４は、syno^{-/-}の MEF 培養細胞における p53 のリン酸化部位を同定した結果を示す写真である。

図５は、シノビオリンに対する siRNA 処理によって亢進した Ser15 のリン酸化がカフェイン添加によりどのように影響するかを調べたウェスタンブロッティングの写真である。

図６は、シノビオリン に対する siRNA 処理による、p53 及び p21 の発現が高まることを示すウェスタンブロッティングの写真である。

図７は、フローサイトメーターによる細胞周期の観察結果を示す図である。

図８は、Tissue array を、抗シノビオリン抗体(10Da)を用いて免疫染色した結果を示す写真である。

図９は、Tissue array を、抗シノビオリン抗体(10Da)を用いて免疫染色した結果を示す写真である。

図１０は、GFP 野生型 p53 を導入した細胞における p53 の局在を観察した写真である。

図１１は、GFP 野生型 p53 及び FLAG 野生型シノビオリンを強発現させて、400 倍希釈一次抗体 α -FLAG 抗体、200 倍希釈二次抗体 α -マウス IgG-TRITC 又は 1 μ M DAPI で核を染色し、p53 の局在を観察した写真

である。

図 1 2 は、GFP 野生型 p53 及び FLAG シノビオリン C307S を強発現させて、400 倍希釈一次抗体 α -FLAG 抗体、200 倍希釈二次抗体 α -マウス IgG-TRITC 又は 1 μ M DAPI で核を染色し、p 53 の局在を観察した写真
5 である。

図 1 3 は、MBP-Synoviolin dTM-His による GST-p53 の in vitro ユビキチン化反応を示す写真である。

図 1 4 は、シノビオリン RNAi による RA 滑膜細胞での p53 mRNA 量を示すグラフである。

10 図 1 5 は、作製した p53 結合ドメイン欠失体の概略図、及び結合アッセイを行った結果を示す図である。

図 1 6 は、p53 結合ドメイン欠失体と ^{35}S -p53 について GST プルダウンアッセイを行った結果を示す図である。

15 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 (p53 癌抑制遺伝子または p53 タンパク質を意味する) を核に局在化及び活性化させることにより、癌を抑制することを特徴とする。本発明は、シノビオリンの
20 発現及び/又は機能を阻害すると、リン酸化酵素により p53 がリン酸化されて p53 が活性化し、そしてサイクリン依存性リン酸化酵素阻害剤である p21 の発現が高まり、その結果、癌細胞の G1 期から S 期への移行が妨げられることにより癌の発生又は増殖を抑制するという知見ならびにシノビオリンがそのユビキチンリガーゼを介して p53 の発現を抑制するという知見に
25 基づき完成されたものである。

1. p53 の活性化

(1) シノビオリンの発現及び/又は機能の阻害と p53 の活性化

正常細胞を紫外線等にさらすと、細胞内の p53 が活性化して、その結果
30 細胞増殖が阻止されることから、p53 の濃度を上昇させることにより、癌細

胞の増殖を止めることができる。つまり、p53 が機能しない場合は、癌細胞の増殖が止められず、癌が進行することになる。事実、p53 は正常な個体の細胞にはほとんど見られないが、癌患者由来の細胞の約半数においてはこのp53 の欠損変異が起こっている。また、このような変異が起こっていない場合でも、p53 の制御機構に何らかの変異が生じて癌抑制機能が失われている。したがって、癌の進行を抑えるには p53 を有効に機能させることが必要である。

本発明においては、p53 の活性化を癌治療の有効な方法の一つとするため、シノビオリンの機能に着目した。そして、シノビオリンホモノックアウト動物を作製し、詳細に解析したところ、野生型に比してアポトーシスを起こしている細胞が多数観察された。すなわち、シノビオリンの機能を阻害すると、アポトーシスに深く関与している p53 の活性化が促進され、シノビオリンの機能阻害が癌抑制につながることを見出した。

ここで、「シノビオリンの発現」とは、シノビオリンをコードする遺伝子の転写及び翻訳が生じること、又はこれらの転写・翻訳によりシノビオリンタンパク質が生成されることを意味する。また、「シノビオリンの機能」とは、p53 の活性化を抑制することを意味し、上記シノビオリンの機能には、シノビオリンが p53 と結合する機能および p53 をユビキチン化する機能も含まれる。従って、「シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害する」とは、野生型シノビオリン遺伝子又はタンパク質の量、機能又は活性と比較して、その量、機能又は活性を低下又は消失させることをいう。上記「阻害」には、機能と発現の両者を阻害すること、及びどちらか一方を阻害することのいずれも含まれる。

シノビオリンは p53 のユビキチン化を促進するため、シノビオリンと p53 との結合を阻害することにより、p53 のユビキチン化を阻害することができ、p53 のユビキチン化を阻害すれば、p53 は活性化され、ひいては癌の抑制につながるといえる。

なお、アポトーシスとは、細胞が自ら引き起こすプログラムされた細胞死を意味し、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表面微絨毛の消失、細胞質の凝集、カスパーゼの活性化、ミトコンドリア膜電位の消失等の特徴

とする。細胞に上記特徴が生じたときに、アポトーシスが引き起こされたと判断する。

本発明において、胎児胚における p53 の免疫染色を行うと、シノビオリンホモノックアウトマウス胎児胚では全身において p53 が強く発現する。

5 また、シノビオリンホモノックアウトマウス胎児胚から単離した胎仔線維芽細胞 (MEFs) も、野生型から単離したものに比して強く発現しており、しかも p53 は核内に強く局在する。この核局在は野生型ではまったく観察されない。また、シノビオリンと p53 を強発現させると、p53 は細胞質内にシノビオリンと共局在する。このことは、シノビオリンの発現及び/又は機能
10 能を阻害することにより、p53 を核内へ移行させることができることを意味する。さらに、シノビオリンホモノックアウトマウス胎仔 MEFs では、高い放射線感受性又は紫外線感受性を示す。従って、本発明において、癌細胞中のシノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 を癌細胞の核に移行させた後に、p53 に対して放射線照射又は紫外線照射を行うと、癌細胞の
15 増殖を効果的に抑制することができる。放射線照射手段は、特に限定されるものではないが、例えばγ線を 1~10 Gy 照射することができる。また、紫外線照射は、紫外線 (波長 100~400 nm、好ましくは 290~400 nm) を、適当な紫外線照射装置 (フナコシ社、デルマレイ社、キーエンス社製等) を用いて照射することができる。

20 さらに、本発明は、核に局在化した p53 を含む細胞 (特に癌細胞) に、さらに抗癌剤を接触させることにより、効率良く癌を抑制することが可能である。あるいは、上記核に局在化した p53 を含む癌細胞の周囲の脈管 (例えば血管又はリンパ管) に塞栓を施すことで、癌を抑制することもできる。

「抗癌剤」には、アルキル化剤、代謝拮抗薬、微小管阻害薬、白金錯化合物、分子標的治療薬などが含まれる。これらの抗癌剤の具体例として以下の
25 ものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

<アルキル化剤>

マスタード系：シクロホスファミド (エンドキサン)、メルファラン等

アジリジン系：チオテパ等

30 アルキルスルホン系：ブスルファン等

ニトロソ尿素系：ニムスチン、ロムスチン等

<代謝拮抗薬>

葉酸誘導体：メトトレキセート等

プリン誘導体：メルカプトプリン、アザチオプリン等

5 ピリミジン誘導体：5-フルオロウラシル、テガフル、カルモフル
等

<微小管阻害薬>

ビンカアルカロイド：ビンクリスチン、ビンブラスチン等

タキサン：パクリタキセル、ドセタキセル等

10 <ホルモン類似薬>

タモキシフェン、エストロゲン等

<白金錯化合物>

シスプラチン、カルボプラチン等

<分子標的治療薬>

15 イマニチブ、リツキシマブ、ゲフィニチブ等

抗癌剤を癌細胞に接触させるための方法は、p53 が核に局在化した細胞
が含まれる細胞又は組織（癌細胞又は癌組織）に、抗癌剤を添加する方法、
あるいは担癌患者又は担癌動物に抗癌剤を投与する方法などが採用される。

20 この場合の抗癌剤の処理量は、特に限定されるものではないが、添加する場
合には 100 pM ~ 100 μ M、好ましくは 1 nM ~ 10 μ M である。動物体内に
投与するときは、例えば抗癌剤としてエンドキサンを使用するときは、0.1
~ 100 mg/kg/day、好ましくは 2 ~ 25 mg/kg/day である。エンドキサン以外
25 の抗癌剤についても、当業者は投与量又は添加量を適宜設定することができ
る。

核に局在化した p53 を含む癌細胞の周囲の脈管に塞栓を施すには、p53
が核に局在化した癌細胞が含まれる細胞集団又は組織の周囲の血管に血栓を
形成させてもよく、血管又はリンパ管については脂肪による塞栓、空気やガ
スによる塞栓を形成させてもよい。

30

(2) シノビオリンの発現及び/又は機能阻害による p53 のリン酸化促進と活性化

さらに、本発明においては、p53 のアミノ酸残基の一部をリン酸化することにより p53 を活性化させることを特徴とする。p53 の活性化につながるリン酸化の対象となるアミノ酸残基は、p53 のアミノ酸配列のうちセリン残基であることが好ましく、第 15 番目のセリン残基(Ser15)がさらに好ましい。

p53 の Ser15 がリン酸化されると、p53 の発現が高まり、転写活性が亢進し、その結果転写産物が増加する。この p53 の Ser15 のリン酸化には、ATM(ataxia-telangiectasia mutated)、ATR(ataxia-telangiectasia related)、等のリン酸化酵素が深く関与している。ATM は、ヒトの常染色体性劣性遺伝疾患である毛細血管拡張性運動失調症の原因タンパク質であり、DNA の損傷を感知して癌抑制遺伝子 p53 をリン酸化することで細胞の増殖をコントロールする機能を有する。ATR は、ATM のファミリーの一つであるが、広範囲にわたる化学療法薬、紫外線の照射、あるいはタンパクリン酸化酵素の抑制により誘導され、かつ、ATM が関与しない p53 の活性化に関与するリン酸化酵素である。

ATM 及び ATR は、カフェインによりその機能が阻害されることが知られているが、本発明においては、シノビオリンの発現及び/又は機能の阻害実験にカフェインを用いることにより、シノビオリンが ATM 及び ATR 活性化を調節していることが判明した。

すなわち、カフェイン非存在下において、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害すると p53 が活性化される。一方、カフェイン存在下でシノビオリンの発現及び/又は機能を阻害すると、p53 の活性化は抑制される。また、カフェインにより ATM 及び ATR の活性 (p53 のリン酸化) が阻害されることは知られている。

カフェインにより ATM 及び ATR の活性を阻害することにより、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害しても p53 は活性化されないことから、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害すると、ATM 及び ATR が活性化されて p53 の活性化を誘導するというメカニズムが考えられる。そうすると、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することによりこれらのリン

酸化酵素活性が高められるといえる。従って、本発明は、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することにより、リン酸化酵素の活性化を促進することを特徴とする。ATM 及び ATR と同様の活性を有する酵素等（P53 をリン酸化する酵素等）は、DNA-PK 又は GSK3 β 等でも良い。

- 5 p53 の Ser15 がリン酸化されることにより発現が誘導される物質としては、p21 というタンパク質が知られている。p21 は、サイクリン依存性リン酸化酵素（CDK）活性の阻害剤として機能し、CDK 活性を阻害することにより、細胞周期の調節を担うタンパク質である。CDK は、細胞周期の抑制の要となり、そのパートナーであるサイクリンタンパク質と共に機能し、例
- 10 えば、細胞の休止状態である G1 期から DNA の複製期である S 期へのスムーズな移行を司る。癌細胞において、p53 が活性化されると、CDK 阻害剤である p21 の発現が高まるため、癌細胞の G1 期から S 期への移行が妨げられることにより癌が抑制される。従って、本発明は、上記のように、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害させることにより、p53 の活性化を
- 15 高めて p21 の発現を誘導させ、CDK の阻害を起こすことにより癌を抑制することを特徴とする。

（3）p53 のユビキチン化の阻害と安定化

- シノビオリンは、p53 をユビキチン化する。ユビキチン化とは、タンパク
- 20 質の分解マーカ分子であるユビキチンによるタンパク質の翻訳後の修飾反応をいう。このユビキチン化の生理的意義は、プロテオソーム系のタンパク質分解機構へ送られるためのタグ修飾として、従来認識されていた。そして、その後の研究により、現時点でのユビキチン化の意義は、タンパク質機能を制御する可逆的タンパク質修飾システムとして位置づけられている。

- 25 ユビキチン化は、具体的には、ユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）およびユビキチンリガーゼ（E3）などの酵素が協同したカスケード反応を繰り返すことにより、基質となるタンパク質にユビキチン分子を枝状に結合させてポリユビキチン鎖を形成する過程をいう。このポリユビキチン鎖は、ユビキチン分子内の 48 番目のリシン残基の ϵ -アミノ基
- 30 を介して形成され、26S プロテアソームへの分解シグナルとなり、標的タン

パク質を分解に導く。

本発明は、シノビオリンの発現及び／又は機能を阻害することにより p53 を活性化させることを特徴とし、このような p53 の活性化は、上記 p53 のリン酸化機構とは別に、p53 のユビキチン化が阻害されるという機構に着目したものである。

(4) シノビオリンと p53 の結合部位の決定

シノビオリンの p53 結合ドメインは、例えば、シノビオリンのアミノ酸配列のうち、ある領域を欠失させた、p53 結合ドメイン欠失体を数種類作製して、³⁵S-p53 について GST プルダウンアッセイを行うことにより決定することができる。具体的には、上記のシノビオリンの p53 結合ドメイン欠失体を GST-融合タンパク質として大腸菌等で発現させて、³⁵S-p53 タンパク質とのタンパク質-タンパク質間結合を GST プルダウンアッセイ法により確認する。

これにより、シノビオリンにおける p53 結合ドメインは、シノビオリンタンパク質に含まれるアミノ酸配列（配列番号 2）の第 236 から 270 番目までの 35 アミノ酸残基であることが判明した。

前記の通り、シノビオリンは p53 のユビキチン化を促進する。従って、シノビオリンの機能の一つである p53 への結合機能を阻害することにより、p53 のユビキチン化が阻害され、p53 が活性化される。p53 との結合に
関与するシノビオリンタンパク質の領域は、好ましくはシノビオリンのアミノ酸配列の第 236 から 270 番目の領域である。従って、主に上記領域を、結合阻害のための標的領域として選択することが好ましい。シノビオリンと p53 との結合を阻害するためには、例えばシノビオリンに対するアンタゴニスト（低分子化合物、ペプチド等）を作用させ、バインディングアッセイ、イーストツーハイブリッド法又はユビキチン化活性測定法により評価することができる。あるいは、シノビオリンの上記第 236 から 270 番目の領域を認識する抗体をシノビオリンと反応させることもでき、これらの方法により、シノビオリンと p53 との結合が阻害される。

2. シノビオリン発現及び/又は機能阻害並びに活性阻害

p53 を活性化するためには、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害する方法が採用される。

シノビオリンの発現及び/又は機能阻害には、特に限定されるものではないが、例えば RNA 干渉 (RNAi) を利用することができる。シノビオリン
5 遺伝子に対する siRNA (small interfering RNA) を設計及び合成し、これを細胞内に導入させることによって、RNAi を引き起こすことができる。

RNAi とは、dsRNA (double-strand RNA) が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害
10 する現象である。例えば、dsRNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制 (ノックダウン) される。

siRNA の設計は、以下の通り行なうことができる。

(a) シノビオリンをコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全て候補にすることが可能である。例えば、ヒトの場合では、GenBank Accession number AB024690 (配列番号 1) の任意の領域を
15 候補にすることができる。

(b) 選択した領域から、AA で始まる配列を選択し、その配列の長さは 19 ~25 塩基、好ましくは 19~21 塩基である。その配列の GC 含量は、例えば 40~60% となるものを選択するとよい。具体的には、配列番号 1 に示される塩基配列のうち、以下の塩基配列から選ばれる少なくとも 1 つの配列を含む DNA を siRNA の標的配列として使用することができる。特に、(i)
20 (配列番号 3)、(ii) (配列番号 4)、(vi) (配列番号 8)、(vii) (配列番号 9)、(viii) (配列番号 10) を標的とすることが好ましい。

(i) AA TGTCTGCATCATCTGCCGA GA (配列番号 3)

25 (ii) AA GCTGTGACAGATGCCATCA TG (配列番号 4)

(iii) AA AGCTGTGACAGATGCCATC AT (配列番号 5)

(iv) AA GAAAGCTGTGACAGATGCC AT (配列番号 6)

(v) AA GGTCTGTGTACATGGCC TT (配列番号 7)

(vi) AA CAAGGCTGTGTACATGCTC TA (配列番号 8)

30 (vii) AA ATGTTTCCACTGGCTGGCT GA (配列番号 9)

(viii) AA GGTGTTCTTTGGGCAACTG AG (配列番号 1 0)

(ix) AA CATCCACACACTGCTGGAC GC (配列番号 1 1)

(x) AA CACCCTGTATCCAGATGCC AC (配列番号 1 2)

(xi) AA GGTGCACACCTTCCCCTC TT (配列番号 1 3)

5 (xii) AA TGTTTCCACTGGCTGGCTG AG (配列番号 1 4)

(xiii) AA GAGACTGCCCTGCAACCAC AT (配列番号 1 5)

(xiv) AA CGTTCCTGGTACGCCGTCA CA (配列番号 1 6)

10 siRNA を細胞に導入するには、in vitro で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

また、本発明は、RNAi 効果をもたらすために shRNA を使用することもできる。shRNA とは、ショートヘアピン RNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有する RNA 分子である。

15 shRNA は、その一部がステムループを構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列 A とし、配列 A に対する相補鎖を配列 B とすると、配列 A、スペーサー、配列 B の順になるようにこれらの配列が一本の RNA 鎖に存在するようにし、全体で 45~60 塩基の長さとなるように設計する。配列 A は、標的となるシノビオリン遺伝子 (配列
20 番号 1) の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列 A の長さは 19~25 塩基、好ましくは 19~21 塩基である。

3. 医薬組成物

25 本発明において作製された shRNA、siRNA は、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害する物質であり、p53 を活性化させる医薬組成物 (特に癌の遺伝子治療剤) として使用することができる。

本発明の医薬組成物を癌の遺伝子治療剤として使用する場合は、適用部位は特に限定されず、脳腫瘍、舌癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、膵
30 臓癌、胆道癌、胆嚢癌、十二指腸癌、大腸癌、肝癌、子宮癌、卵巣癌、前立

腺癌、腎癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、線維肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、皮膚癌、各種白血病（例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、成人型 T 細胞白血病、悪性リンパ腫）、等を対象として適用される。上記癌は、原発巣であっても、転移したものであっても、他の疾患と併発したものであってもよい。

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。siRNA や shRNA を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。脳等に局所投与することもできる。

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えばアデノウイルスの場合の投与量は 1 日 1 回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1 週～8 週間隔で投与される。

siRNA 又は shRNA を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 MEF 培養細胞における p53 の活性化の検討

シノビオリンホモノックアウトマウス（syno^{-/-}）胎児線維芽細胞(MEFs)における p53 をウェスタンブロッティングにより検出し、さらに細胞を免疫組織染色により確認した。

すなわち、免疫染色法は、MEFs を常法に従いスライドガラス上に固定し、抗 p53 抗体（マウスモノクローナル抗体 BD : Becton, Dickinson 社）を用いて免疫染色を行った。3% 牛血清アルブミン（BSA）で 30 分ブロッキングを行った標本に、0.3%BSA で希釈した抗 p53 抗体（BD : 10 μ g/ml）を室温で 60 分免疫反応させた。反応後の標本を PBS で洗浄後、TRITC 標識抗マウス IgG 抗体（Dako 社）を 2 次抗体として免疫反応させた。抗 p53 抗体に免疫反応する抗原の確認は、蛍光顕微鏡で行った。

その結果、野生型に比し、syno^{-/-}の MEF 培養細胞では p53 の活性化を起こしている細胞が多数確認された（図 1、「MEF^{-/-}」のパネル）。

〔実施例 2〕 syno^{-/-}マウスにおける p53 活性化の検討

syno^{-/-}マウスにおける p53 活性化の検討を、embryo を用い免疫染色により行った。

すなわち、syno^{-/-}の胎仔における免疫染色は、常法に従い組織をスライドガラス上に固定し、ベクタステイン ABC キット(VECTOR 社)を用いて行った。ブロッキング試薬で 30 分ブロッキングした標本に対して、5 μ g/ml に希釈した抗 p53 抗体 FL393 を室温で 60 分間免疫反応させた。反応後の標本を PBS で洗浄し、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体として免疫反応させた。抗 p53 抗体に免疫反応する抗原は、HRP 活性に基づく 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩の発色により確認した。対比染色としてメチルグリーン染色を行った。

この結果、syno^{-/-}の embryo における p53 が活性化していることが確認された（図 2）。

〔実施例 3〕 p53 に対するシノビオリンの効果

syno^{-/-}の MEF 培養細胞における p53 をウェスタンブロッティングにより検出した。

すなわち、各種細胞を細胞破碎液（50 mM Tris-HCl（pH8.0）、150 mM NaCl、1% NP40、1 mM PMSF、0.1% sodium dodecyl sulfate（SDS）、2 μ g/ml Leupeptin、2 μ g/ml Aprotinin、2 μ g/ml Pepstatin）を

用いて細胞破碎画分を調製した。その後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により細胞破碎画分を分離した。SDS-PAGE 後、細胞由来タンパク質は、エレクトロブロッティング法によりニトロセルロース (NC) 膜に転写した。この NC 膜に対し、5%スキムミルクを加えた Tris buffered saline (TBS) で室温、1 時間ブロッキングした後、抗 p53 抗体 c-terminal aa;195-393 または FL393 を 5%スキムミルクを加えた TBS で希釈して室温、1 時間免疫反応させた。反応後の NC 膜を 0.1% Tween20/TBS で洗浄し、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を 2 次抗体として室温、1 時間免疫反応させ、0.1% Tween20/TBS で洗浄し、HRP 活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP 活性の検出には ECL キット (Amersham 社) を用いた (Clinical Chemistry. 25, p1531, 1979)。

その結果、ウェスタンブロッティングにより syno^{-/-}の MEF 培養細胞における p53 発現量が増加していることが確認された (図 3)。

〔実施例 4〕 syno^{-/-}の MEF 培養細胞における p53 のリン酸化部位の同定

本実施例においては、抗 p53 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより p53 のリン酸化部位の同定を行った。

すなわち、p53 (配列番号 17) の異なるセリン残基のリン酸化を認識する 4 種の抗リン酸化 p53 モノクローナル抗体 (Phospho-p53(ser15)、Phospho-p53(ser20)、Phospho-p53(ser37)および Phospho-p53(ser46); Becton, Dickinson 社) を用いて、MEF 細胞の蛋白質を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロッティング法を行った。ウェスタンブロッティング法の操作は、一次抗体として抗リン酸化 p53 モノクローナル抗体を、そして標識抗体として抗マウス IgG ヒツジ-HRP を用いる他は実施例 3 に記載のとおりである。

その結果、syno^{-/-}の MEF 培養細胞において、p53 のアミノ酸配列 (配列番号 17) 中、第 15 番目のセリン残基のリン酸化が顕著であった (図 4)。

図 4 において、左上のパネルが、第 15 番目のセリン残基がリン酸化された

ものである。53 kDa 付近のバンドが顕著に濃く表れている。

〔実施例 5〕 Ser15 のリン酸化亢進のメカニズムの解明

細胞株として野生型の p53 を発現していることが確認されている
5 RKO(ヒト大腸がん由来細胞株)を 60 mm プレートに 1.0×10^5 細胞/プレート
/2 mL で細胞を播種し、Oligofectamine を用いて GFP およびシノビオリン
に対する siRNA をトランスフェクトした後、72 時間後に Ser15 のリン酸
化に重要な ATM(ataxia-telangiectasia mutated)および ATR(ATM and
Rad3 related)の阻害剤であるカフェイン(10 mM)を添加し、リン酸化
10 Ser15-p53 に対する抗体 Phospho-p53(ser15)を用いてウェスタンブロッ
ティングを行った。

その結果、シノビオリン に対する siRNA によって亢進した Ser15 のリ
ン酸化はカフェイン添加 (添加後 12 時間、24 時間) により、完全に阻害さ
れた (図 5)。よって、シノビオリンは通常、ATM および ATR の機能を
15 阻害することで、p53 の抑制をしていることが示された。

〔実施例 6〕 p53 により誘導される p21 の発現にシノビオリンが及
ぼす影響

RKO 細胞をシノビオリンに対する siRNA 処理し、p53 の転写産物である
20 p21 の発現の変化をウェスタンブロットティングで検討した。

すなわち、抗 p21 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz 社) を用いて、細胞
株として野生型の p53 を発現していることが確認されている RKO(ヒト大
腸がん由来細胞株)を 60 mm プレートに 1.0×10^5 細胞/プレート/2 mL で細
胞を播種し、Oligofectamine を用いて GFP およびシノビオリンに対する
25 siRNA をトランスフェクトした後、72 時間後の蛋白質を SDS-PAGE で分
離し、ウェスタンブロットティング法を行った。ウェスタンブロットティング法
の操作は、一次抗体として抗 p21 ポリクローナル抗体を、そして標識抗体
として抗マウス IgG ヒツジ-HRP を用いる他は実施例 3 に記載のとおりで
ある。

30 その結果、シノビオリン に対する siRNA 処理によって、p53 の発現が高

まると同時に、p21 の発現も増加した。この効果は 72 時間で明確に示された（図 6）。

〔実施例 7〕 シノビオリン発現阻害による p53 関連タンパク質の発現、細胞周期への影響等の検討

本実施例においては、滑膜細胞におけるシノビオリンを、RNAi 効果により阻害した際の p53 関連タンパク質の発現、細胞周期への影響の検討を行った。

RA 滑膜細胞を 10 cm ディッシュに 9.0×10^4 細胞で播種し、シノビオリン siRNA（最終濃度 25 nM）をトランスフェクトした後、フローサイトメーターにより細胞周期を観察した。その結果、siRNA 25 nM(No.589)では、G0/G1 期における細胞周期の遅延が見られた（図 7）。

siRNA としては h589 を用いた。

なお、h589 とは、以下のセンス鎖及びアンチセンス鎖ををアニールさせた 2 本鎖 RNA を意味する。

センス鎖 h589 : GGU GUU CUU UGG GCA ACU G TT（配列番号 18）

アンチセンス鎖 h 589 : CAG UUG CCC AAA GAA CAC C TT（配列番号 19）

〔実施例 8〕 癌組織におけるシノビオリンの発現の検討

Tissue array (CHEMICON 社: 10 common human cancer tissue with normal human tissue)を、抗シノビオリン抗体(10Da)を用いて免疫染色した。

免疫染色に使用した抗体濃度は $8 \mu\text{g/ml}$ であり、使用したキットはシンプルステイン MAX (M)である。

その結果、正常組織でのシノビオリンの発現は、大腸、腎、肺、卵巣、精巣、皮膚及び乳腺で認められたのに対し、神経及びリンパ節では認められなかった。また、各腫瘍組織においてシノビオリンの発現が確認され、特に、発現が明らかに亢進していると判断された組織は、神経・リンパ節であった

(図 8 及び図 9)。

〔実施例 9〕 培養細胞中でシノビオリン及び p53 を共発現させた場合の各々の局在への影響

5 3 種類のプラスミド、GFP-p53、FLAG-synoviolin、および FLAG-synoviolin C307S(ユビキチン (Ub) 化活性なし)を Saos 2 細胞に導入した。
各プラスミドは、以下の通りである。

GFP-p53 : Green fluorescence protein と野生型 p53 のフュージョン蛋白発現

10 FLAG-synoviolin : FLAG タグつき野生型シノビオリン発現

FLAG-synoviolin C307S(ユビキチン (Ub) 化活性なし) : FLAG タグつき失活型シノビオリン発現

fuGENE6 (Roche)によるトランスフェクション処理して 24 時間後に
15 10%ホルマリンで固定し、400 倍希釈一次抗体 α -FLAG 抗体、200 倍希釈二次抗体 α -mouse IgG-TRITC、1 μ M DAPI で核を染色して、その局在を観察した。

その結果、野生型 p53 は強発現させると核に局在することが観察された (図 10)。野生型シノビオリンは強発現すると細胞質 (特に核周辺) に局在した。また、野生型 p53 と野生型シノビオリンを強発現させると、本来核に局在する p53 が核周辺に細かいドット状に分布し、シノビオリンと共局在していることが観察された (図 11)。野生型 p53 とシノビオリン C307S mutant を強発現させると、p53 が細胞質内に大きなドットを形成し、シノビオリンと共局在していることが観察された (図 12)。

25 以上のことから、シノビオリンと p53 は一定条件下で共局在することが示された。ユビキチン化活性の有無でその局在の形態が変化することが考えられる。

〔実施例 10〕 MBP-Synoviolin dam-His による GST-p53 の in
30 vitro ユビキチン化の検討

シノビオリンの細胞内における増減により p53 の細胞内タンパク質量の変動が観察されており、シノビオリンによる p53 の制御が示唆されている。そこで、シノビオリンが直接 p53 をユビキチン化 (Ub) するか否かを調べるために、GST-p53 および MBP-Synoviolin dTM-His を用いて in vitro Ub 化反応の検討を行った。

GST-p53 : N 末端側に GST を融合させた p53 を大腸菌内で発現させ、それを生成して得た画分。

MBP-Synoviolin dTM-His : N 末端側に MBP, C 末端側に His タグを融合させたシノビオリンを大腸菌内で発現させ、それを精製して得た画分。

pGEX/p53 を保持した大腸菌(BL21)を 500ml の LB 培地で培養し、IPTG による誘導後(1 mM、30℃、6h)、培養液より 0.5% NP-40 を含む緩衝液を用いて大腸菌抽出液を調製した。

大腸菌抽出液より GST-p53 を GSH-セファロース樹脂を用いて 0.1% NP-40 存在下で精製した。その透析後の試料を用いて、MBP-Synoviolin dTM-His および他の in vitro Ub 化反応に用いる組成物 (ATP、PK-His-HA-Ub、yeast E1、His-UbcH5c) を組み合わせて反応を行った (図 1 3)。反応後、タンパク質を 7.5% SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜上に転写して抗 p53 抗体(FL393 あるいは DO-1)により膜上の p53 タンパク質を検出した。

また、GST-p53 の添加量を変化させて同様の反応および検出を行った。

その結果、GST-p53 精製画分および MBP-Synoviolin dTM-His を含む全ての組成物を添加した場合に、約 90kDa の位置を中心として p53 由来のラダー状のシグナルが観察された (図 1 3)。また、それらのシグナルは、GST-p53 の添加量に依存して増強した。これらの結果から、シノビオリンが直接 p53 のユビキチン化に関与していると言える。従って、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することにより、p53 のユビキチン化を抑制できることが示された。

〔実施例 1 1〕 RNAi 下におけるシノビオリン、p53 mRNA 量の検

討

本実施例では、シノビオリン RNAi 条件下において、シノビオリン及び関連遺伝子について、経時的に mRNA 量の変化を検討することでシノビオリンが細胞周期、アポトーシスなどへ及ぼす影響を検討した。

RA 滑膜細胞を 30000cells/10cm ディッシュで播種し、定法に従い 25nM siRNA (No. 589) をトランスフェクションし、細胞培養 4 日間の間、経時的に細胞を回収し、mRNA を得た。1 μ g の mRNA をテンプレートとし、ランダムプライマーを用いて逆転写 PCR を行い、cDNA を得た。得られた cDNA について、ABI TaqMan Gene expression assay (GEX)を用いて、定量を行った。対照遺伝子を 18S rRNA として mRNA 量を算出した。

GEX 試薬ターゲットアッセイ No. (アッセイ ID) は、シノビオリンが Hs00381211_m1、TP53 が Hs00153340_m1 である。

その結果、シノビオリン siRNA 存在下では、シノビオリン mRNA 量が減少するが、p53 の mRNA 量は変化していないことが確認された (図 1 4)。

[実施例 1 2] シノビオリンの p53 結合ドメインの決定

GST-Synoviolin と p53 が In vitro プルダウンアッセイで結合し、それにはシノビオリントタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) の第 236 から 270 番目までの 35 アミノ酸残基が必要十分である。

そこで、本実施例では、さらに、シノビオリンが p53 に結合するために必要なドメインを同定するために、図 1 5 に示すように、シノビオリンの p53 結合ドメイン欠失体を作製して、³⁵S-p53 について以下の通り GST プルダウンアッセイを行った (図 1 6)。

100 μ L の Competent cell (BL-21 株) を 1 μ L の各 GST タンパク質をコードしたプラスミドで形質転換した。各 GST タンパク質とプラスミドの名前は以下のとおりであった。

GST タンパク質 : プラスミド

GST : pGEX-6P-1 (Pharmacia Biotech)

GST-Syno Δ TM 236-617 : pGEX-5-1 / Δ TM

GST-SynoΔTM 236-270 : p6-3

GST-SynoΔTM 271-617 : pST490

4 mL の LB-Amp+に接種し、37℃で一晩培養した。翌日 Pre-culture の
 5 OD600 を測定し、15 ml の LB-Amp+に OD600=3.0 相当を接種した（終濃
 度≒0.2）。25℃恒温槽で約 2 hr 培養し、OD600=0.6~0.8 になったことを
 確認した後、恒温槽に氷を加えて 20℃に冷却し、培養容器を 10 分つけて
 20℃まで冷却した。0.1M IPTG を 15 μL（終濃度=0.1 mM、通常の
 1/1000）、1 mM ZnCl₂を 150 μL（終濃度=10 μM）加えて、20℃で 4 hr
 10 震盪培養し GST タンパク質の発現を誘導した。誘導後、遠心して細胞を回
 収した（5000 rpm、5 min、4℃）。1 ml PBS(-)に細胞を再懸濁し、エッペ
 ンドルフチューブに移し、細胞を回収した（14000 rpm、1 min、4℃）。
 上清を全て吸い取った後、500 μL の PBS(-) / Z （PBS(-) / 10 μM ZnCl₂）
 に再懸濁し、液体窒素で凍結、-20℃で保存した。翌日-20℃のサンプル
 15 を 37℃の恒温槽に 10 min つけて融かし、次に氷水中につけて 0℃まで冷却
 した。以下のプロテアーゼ阻害剤を混合し、1 サンプルあたり 6.5 μL 加え
 た。

	100 mM PMSF (Final 1 mM)	20 μl
20	Aprotinin (Final 0.1%)	2 μl
	0.5 mg /ml PepstatinA (Final 0.5 μg/ml)	2 μl
	1 mg / ml Leupeptin (Final 1 μg/ml)	2 μl

各サンプルを超音波破碎した（Power Level 7、15 秒、3 回）。一回ごと
 25 に氷水中に 30 秒つけて冷却した。次に 500 μL の 2 x GST Buffer / Z
 （2% TritonX-100、720 mM NaCl、1 x PBS(-)、10 μM ZnCl₂、10 mM
 β-Mercaptoethanol、2 mM PMSF、0.1%aprotinin）を加え混合後、さら
 に超音波破碎した（Power Level 7、15 秒、1 回）。破碎した液を
 14000rpm 30min 4℃で遠心した。この間に 1ml の 1 x PBS(-)で 200 μL の
 30 80%-slurry Glutathione Sepharose ビーズを 3 回洗い、160 μL の 1 x

PBS(-)を加え、50%-slurry に調整した。遠心後の上清 1 ml に 80 μ L の 50%-slurry Glutathione Sepharose ビーズを加え、4°Cで 2 hr Rotation して GST タンパク質をビーズに結合させた。1 mL の 1 x GST-Buffer / Z (1% TritonX-100、360 mM NaCl、0.5 x PBS(-)、5 μ M ZnCl₂、5 mM β -mercaptoethanol、1 mM PMSF、0.05% aprotinin) で 4 回ビーズを洗った。遠心は 2000rpm、1min、4°Cで行った。残った上清を全てきれいに吸いとった後、60 μ L の 1 x GST-Buffer / Zを加え、合計 100 μ Lにした。このうち 10 μ L を等量の 2 x SDS Sample Buffer と混ぜ、100°C、5 min、ヒートブロックで熱し、10 μ L ずつ 10%ゲルに Apply した。同時に 0.25~4 μ g の BSA も Apply した。泳動 (150 V 50 min)、CBB 染色 (未使用のもので 30 min)、脱色 (1 hr を 2 回)、グリセロール水 (30~60 min)、(ゲル乾 (80°C、1 hr) して、GST タンパク質の発現、回収効率をチェックした。翌日、³⁵S-p53 の In vitro Translation を行った。まず、以下の試薬を混合した。

15

TNT Reticulocyte Lysate (-80°C)	25 μ L
TNT Reticulocyte Buffer (-80°C)	2 μ L
Amino Acids Mixture (-Met) (-80°C)	1 μ L
DEPC-treated Water	15 μ L
RNase Inhibitor (培養室-20°C)	1 μ L
TNT polymerase (培養室-20°C)	1 μ L
³⁵ S-Met	4 μ L
<u>Plasmid (p53-HA)</u>	<u>1 μ L</u>
Total	50 μ L

25

30°C恒温槽で 1.5~2.5 hr 保温し、In vitro Translation した。この間に G-25 カラムのふたを緩めて軽く遠心 (2500 rpm、1 min、4°C) し、100 μ L の Pull-down Buffer V (20 mM HEPES pH 7.9、150 mM NaCl、0.2% Triton X-100) を乗せてさらに遠心し、カラムを洗った。このカラムに In vitro Translation 溶液を 50 μ L 全量乗せて遠心した (2500rpm、1min、

30

4℃)。さらに 200 μ L の Pull-down Buffer V を乗せて、再度遠心した (2500rpm、1min、4℃)。これを In vitro Translation Product (IvTL) として用いた。そのうち 4 μ L を、16 μ L の Milli-Q、20 μ L の 2 x SDS Buffer と混ぜ、On put 10%とした。30 μ g の GST タンパクが結合した
5 ビーズを含んだ 1 ml の Pull-down Buffer V に 120 μ L の IvTL を加え、4℃で 1 hr Rotation した。遠心 (10000 rpm、1 min、4℃) した後、上清を 370 μ L ずつ GST、各 GST-Synoviolin ビーズを含んだ 1 ml の Pull-down Buffer V に加え、4℃で 1 hr Rotation した。このビーズを 1 ml の Pull-down Buffer V で 4 回洗った。この時上清は必ず 100 μ L ぐらい残し、
10 ビーズを吸い取らないようにした。遠心は 2500 rpm、1 min、4℃で行った。上清を吸いとった後、40 μ L の 1 x SDS Sample Buffer を加えて、Pull-down サンプルとした。On put 10%と Pull-down サンプルを 100℃で 5min、熱し、-20℃で保存した。翌日サンプルを 37℃の恒温槽で 10min 温め、10 μ L ずつ 10%ゲルに Apply した。泳動 (150 V 50 min)、CBB 染色
15 (30 min)、脱色 (1hr x 2)、グリセロール水 (30~60 min)、ゲル乾 (80℃、1hr) した後、IP Plate に露光させた。14 時間後、露光した IP Plate を BAS で読み取り、ImageGauge で定量した。また C.B.B.染色したゲルはフィルムスキャナーで読み取った。

その結果、p53 結合ドメイン欠失体は結合活性をほぼ完全に失っていた。
20 また、図 1 5 から、p53 結合ドメインは 236 から 270 アミノ酸の 35 アミノ酸の一ヶ所のみであると考えられる。

産業上の利用可能性

本発明により、p53 癌抑制遺伝子の活性を促進する物質が提供される。この物質は、p53 を活性化して p53 を核に移行させることができるため、癌
25 の治療用医薬組成物として有用である。本発明において、シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することにより、癌の治療が可能となる。

配列表フリーテキスト

30 配列番号 1 7 : 合成オリゴヌクレオチド (DNA/RNA 混合物)

配列番号 18 : 合成オリゴヌクレオチド (DNA/RNA 混合物)

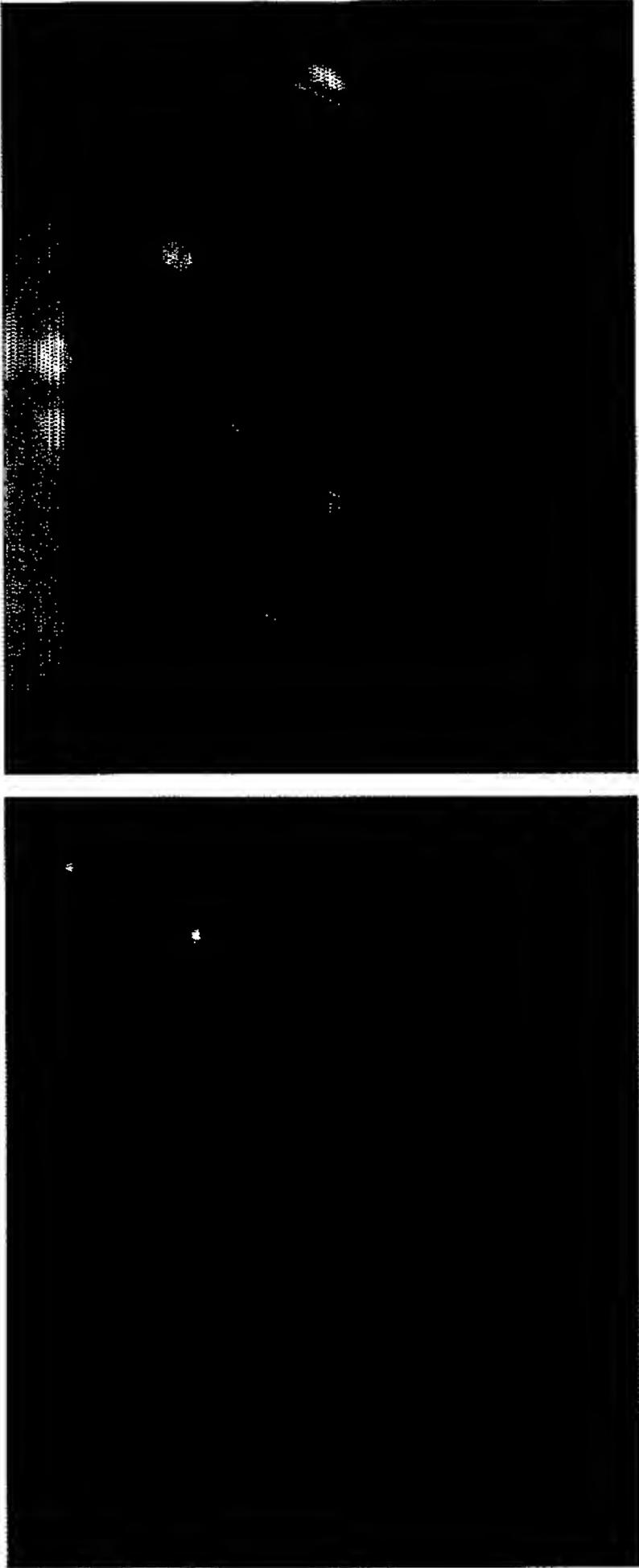
請 求 の 範 囲

1. p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性を促進する物質を含む医薬組成物。
- 5 2. p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化を促進する物質が、シノビオリンの発現及び/又は機能阻害物質である請求項 1 記載の医薬組成物。
3. シノビオリンの発現及び/又は機能阻害物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 2 記載の医薬組成物。
- 10 4. シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 に示される塩基配列を含むものである請求項 3 記載の医薬組成物。
5. siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 3 記載の医薬組成物。
- 15 6. 癌を治療するための請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
7. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする p53 癌抑制遺伝子又は p53 タンパク質の活性化方法。
8. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする p53 タンパク質の核への局在化方法。
- 20 9. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 タンパク質を核に局在化させることを特徴とする癌の抑制方法。
10. 核に局在化した p53 タンパク質に、さらに放射線照射又は紫外線照射を行うことを特徴とする請求項 9 記載の方法。
11. 核に局在化した p53 タンパク質を含む細胞に、さらに抗癌剤を接触させ、又は当該細胞の周囲の脈管に塞栓を施すことを特徴とする請求項 9 記載の方法。
- 25 12. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、p53 タンパク質のアミノ酸残基の一部をリン酸化する方法。
13. アミノ酸残基の一部が、第 15 番目のセリン残基である請求項 12 記載の方法。
- 30

- 1 4. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、リン酸化酵素の活性化方法。
- 1 5. リン酸化酵素が ATM 若しくは ATR 又はこれらと同様の活性をもつ酵素等である請求項 1 4 記載の方法。
- 5 1 6. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することにより p53 タンパク質を活性化し、活性化された p53 タンパク質により p21 タンパク質の発現を誘導する方法。
- 1 7. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害して p53 タンパク質に p21 タンパク質の発現を誘導させることを特徴とする癌の抑制方法。
- 10 1 8. シノビオリンの発現及び/又は機能を阻害することを特徴とする、p53 タンパク質を活性化する方法。
- 1 9. シノビオリンの発現阻害が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA によるものである請求項 7 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 15 2 0. シノビオリンの機能阻害が、シノビオリンの p 53 タンパク質への結合機能阻害および/又はユビキチン化阻害である請求項 7 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 2 1. シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 に示される塩基配列を含むものである請求項 1 9 記載の方法。
- 20 2 2. siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 1 9 記載の方法。

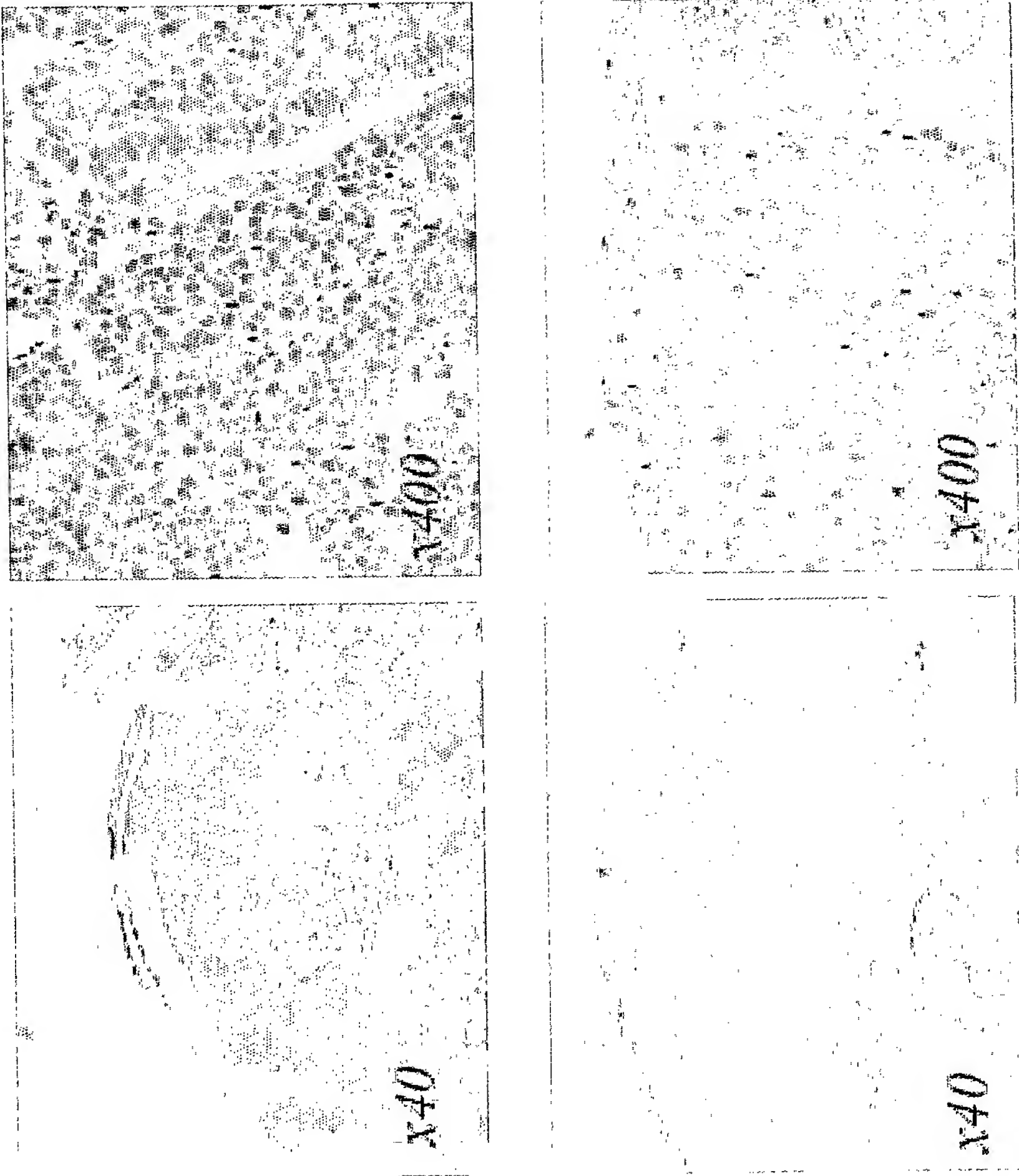
図1

MEF WT MEF +/-



抗-p53(BD)
マウスモノクローナル抗体
(10 μ g/ml)

図2



syno^{-/-}

syno^{+/+}

図 3

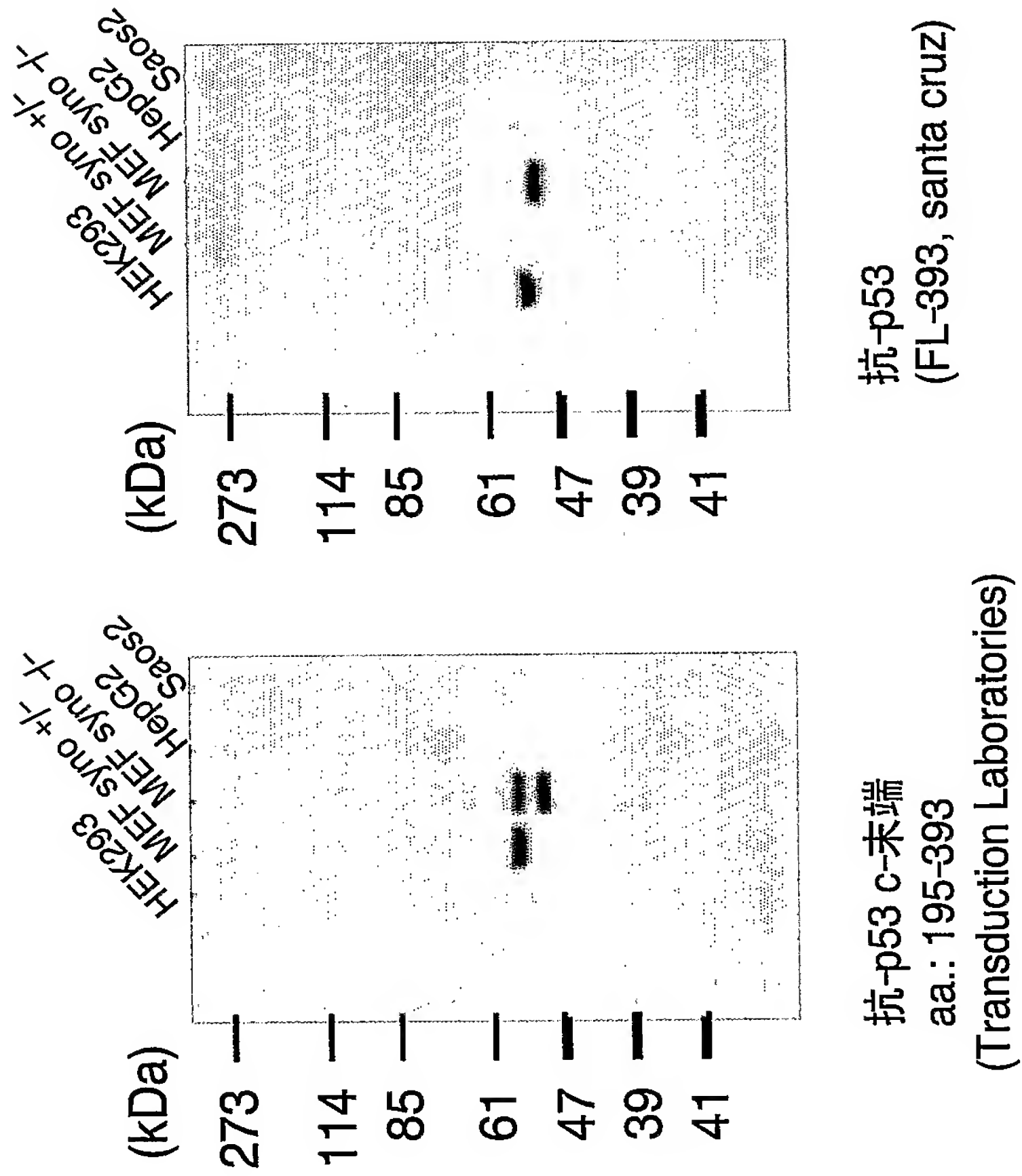


図 4

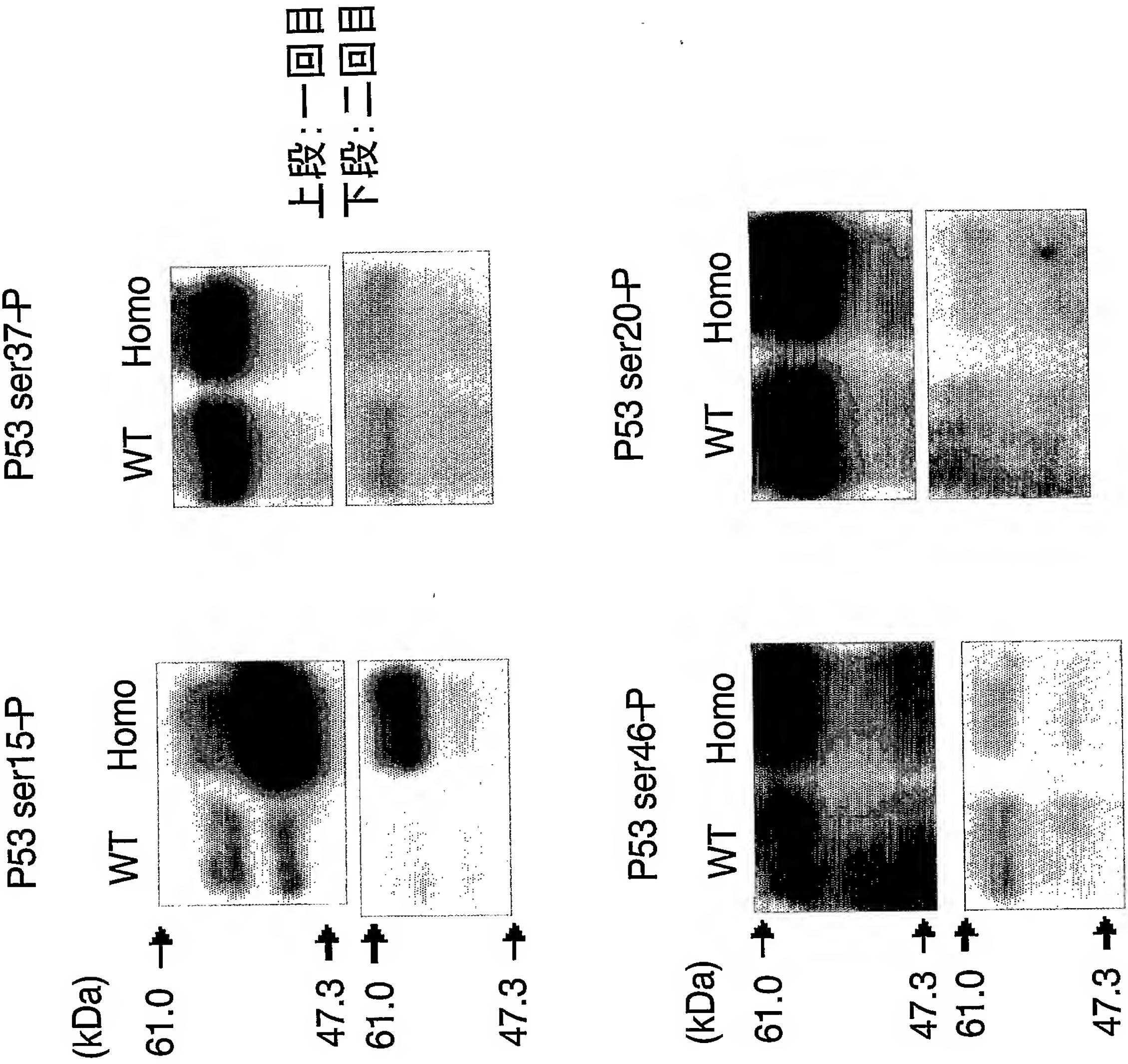


図 5

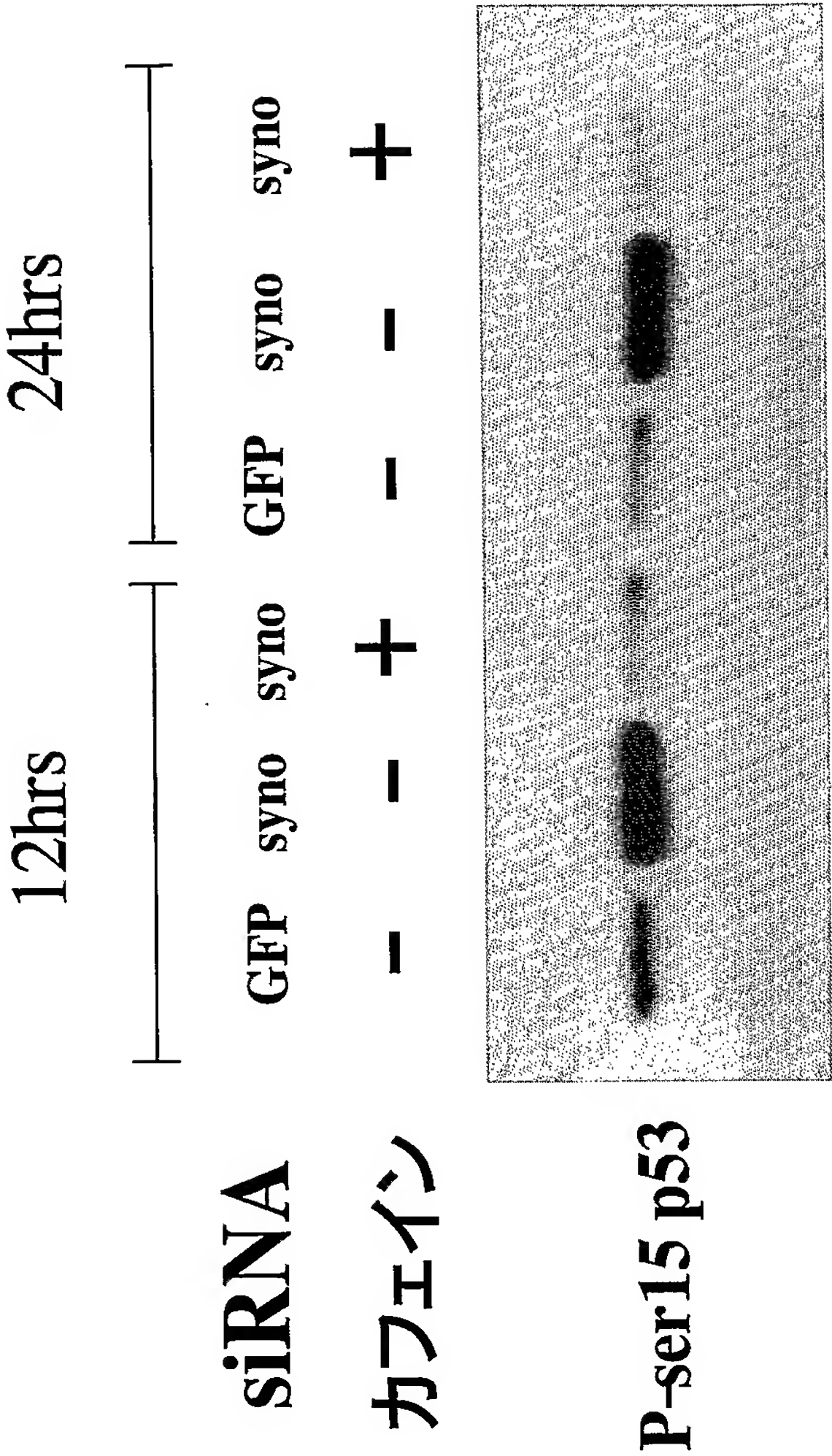


図 6

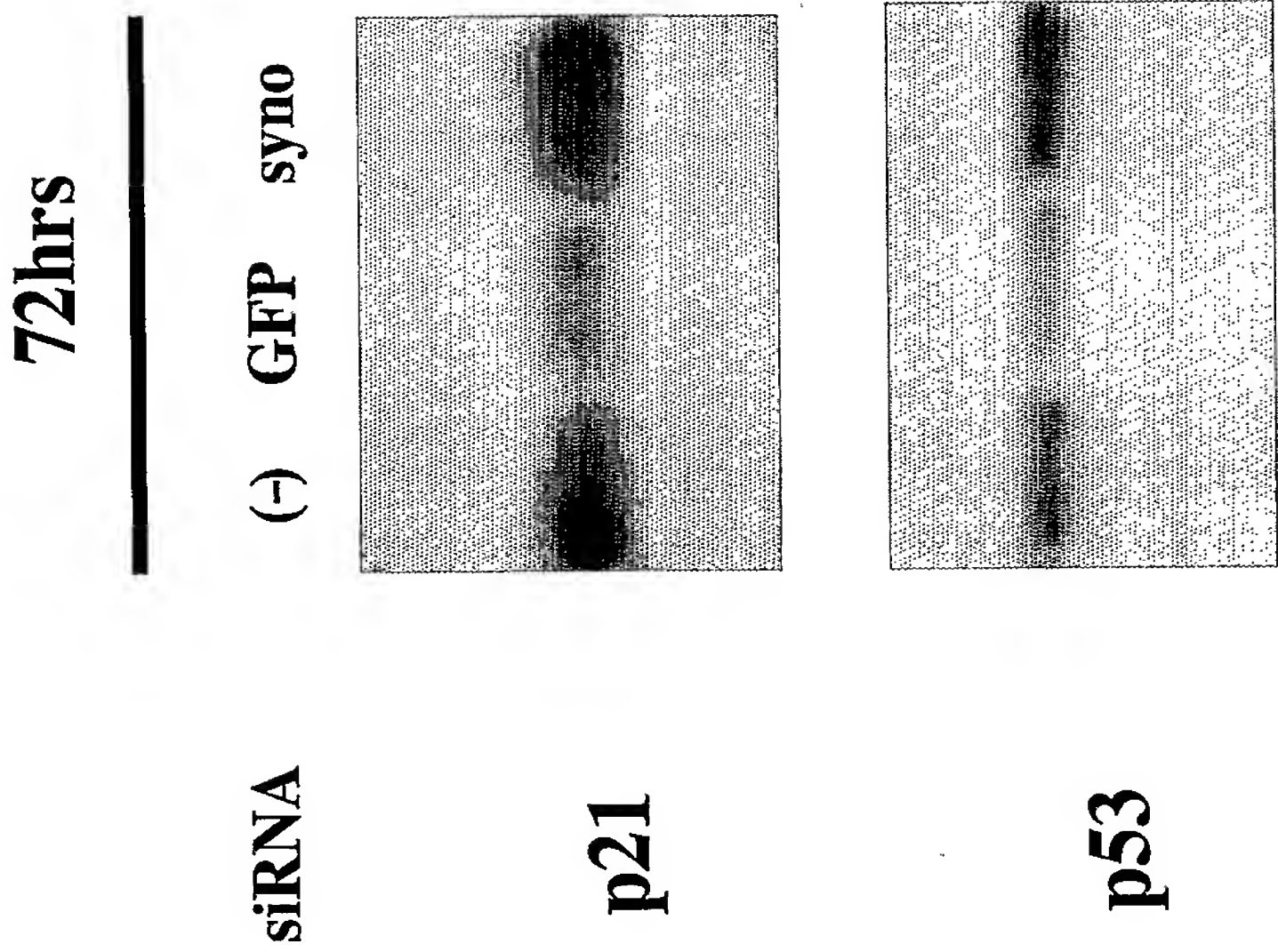


図7

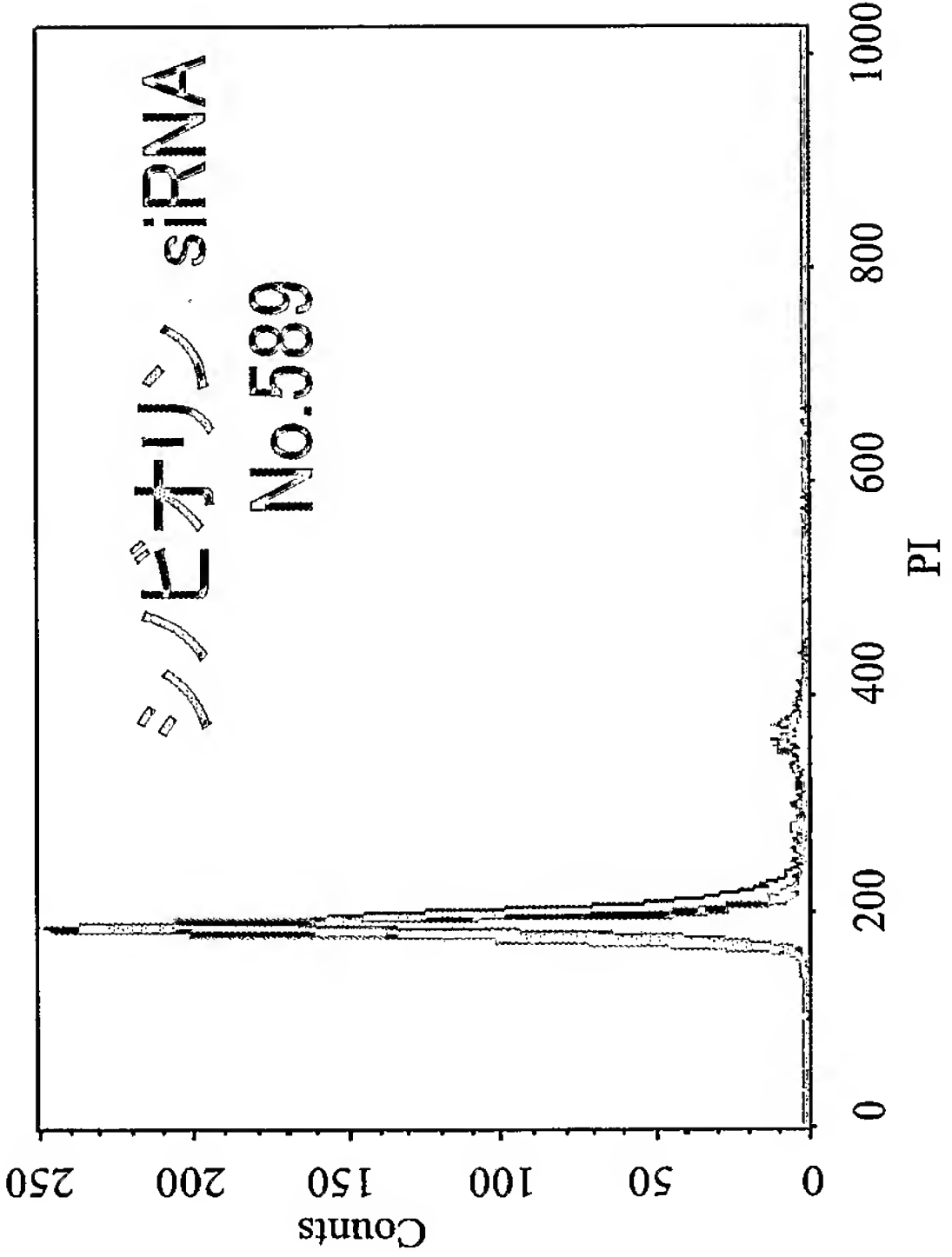
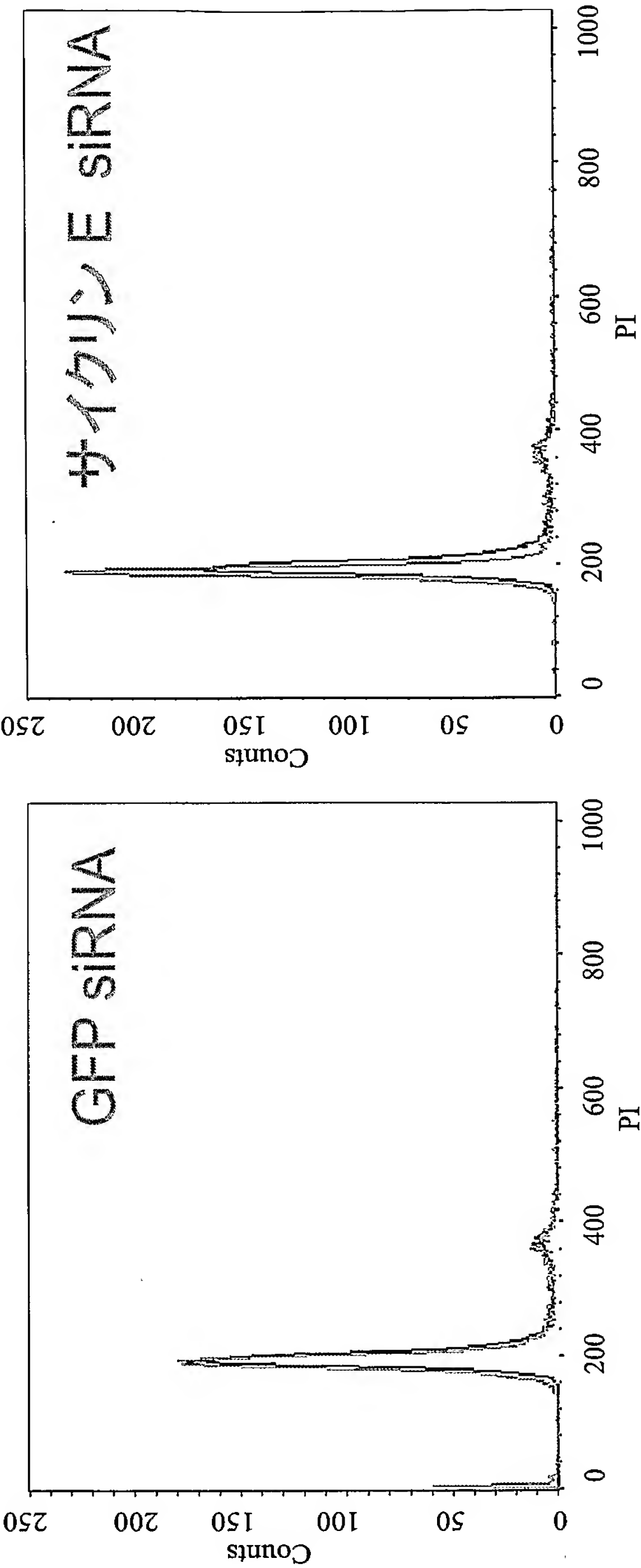


図8

ヒト腫瘍組織におけるシノビオリンの発現

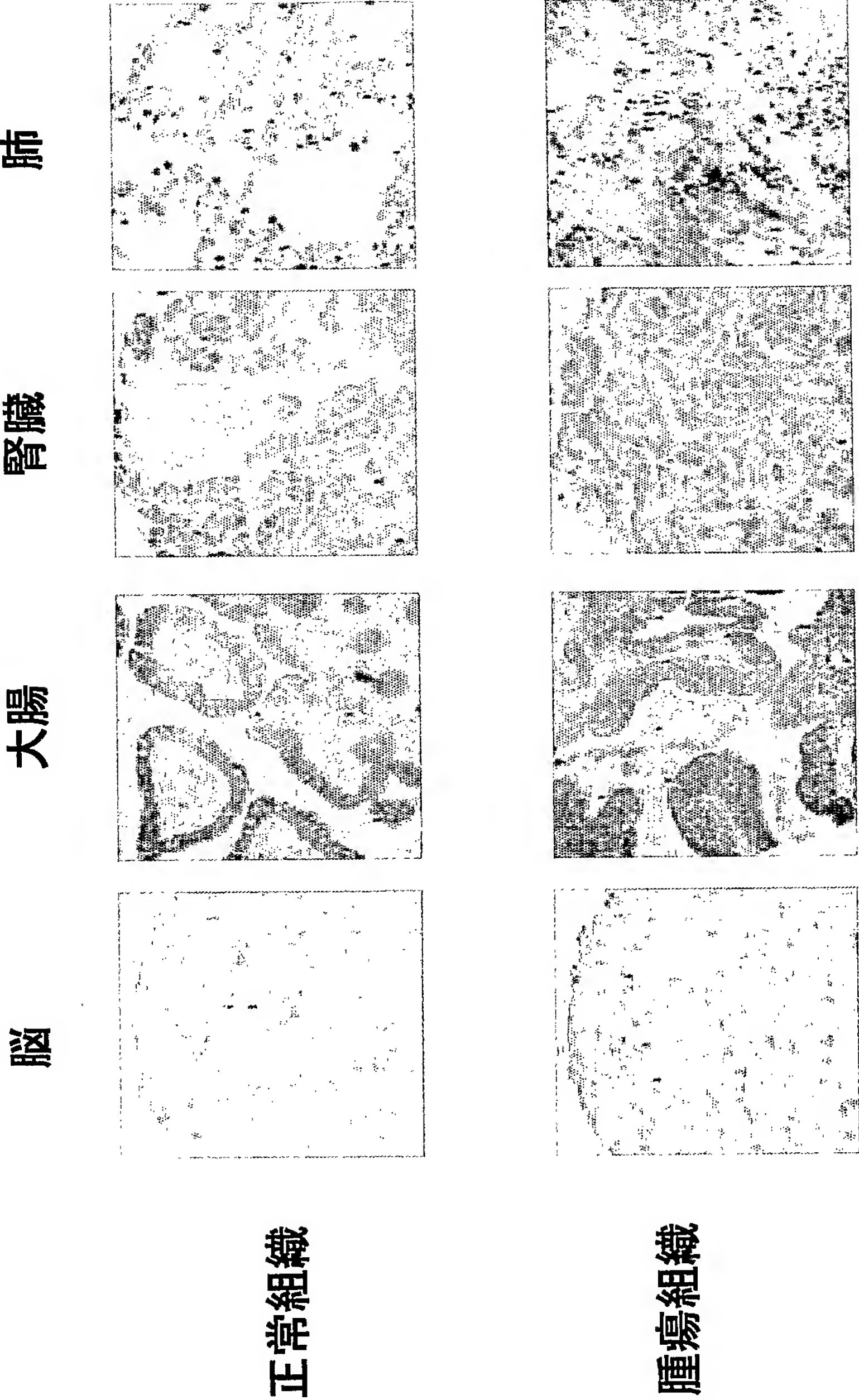


図9

ヒト腫瘍組織におけるシノビオリンの発現

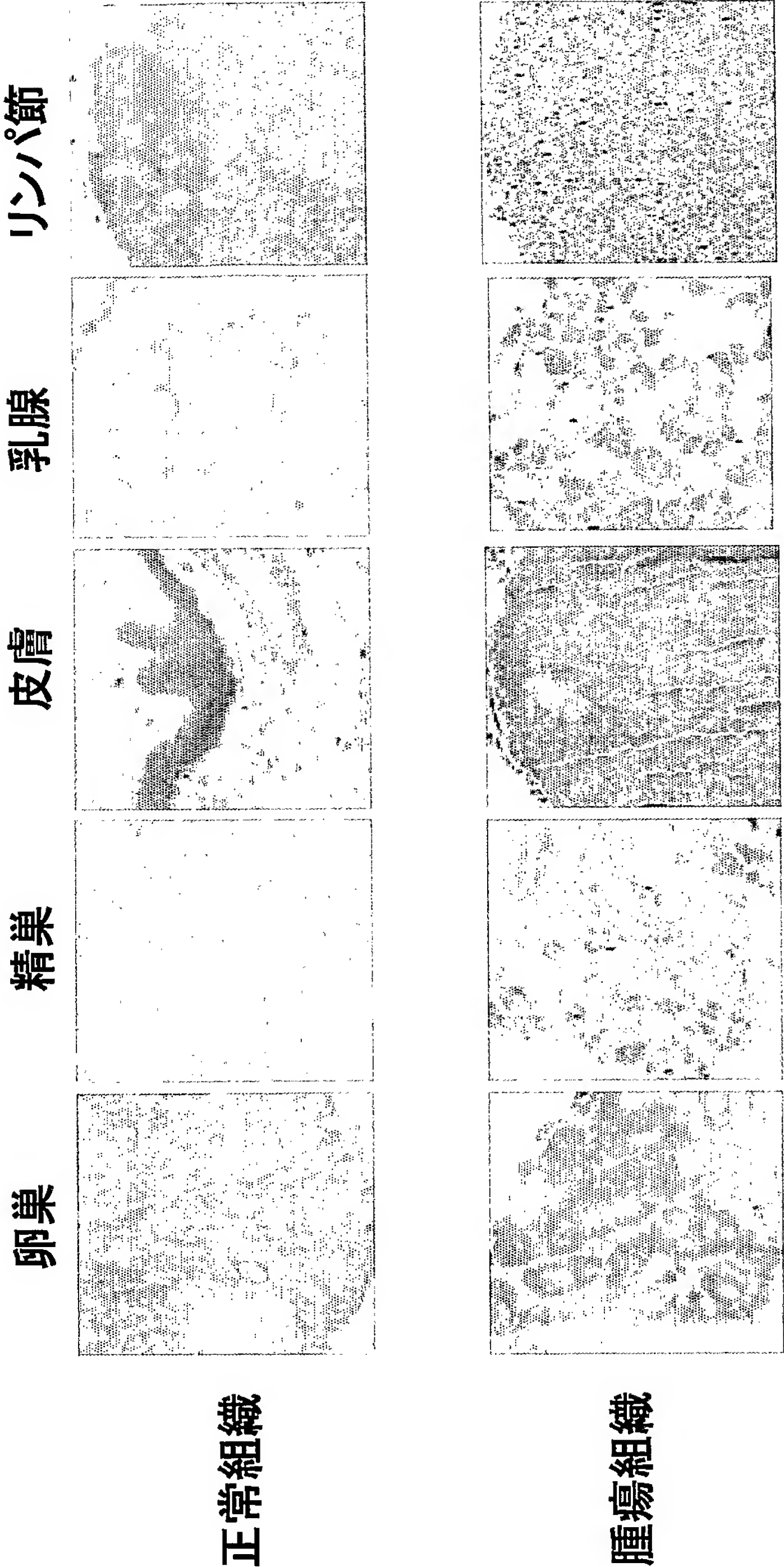


図10

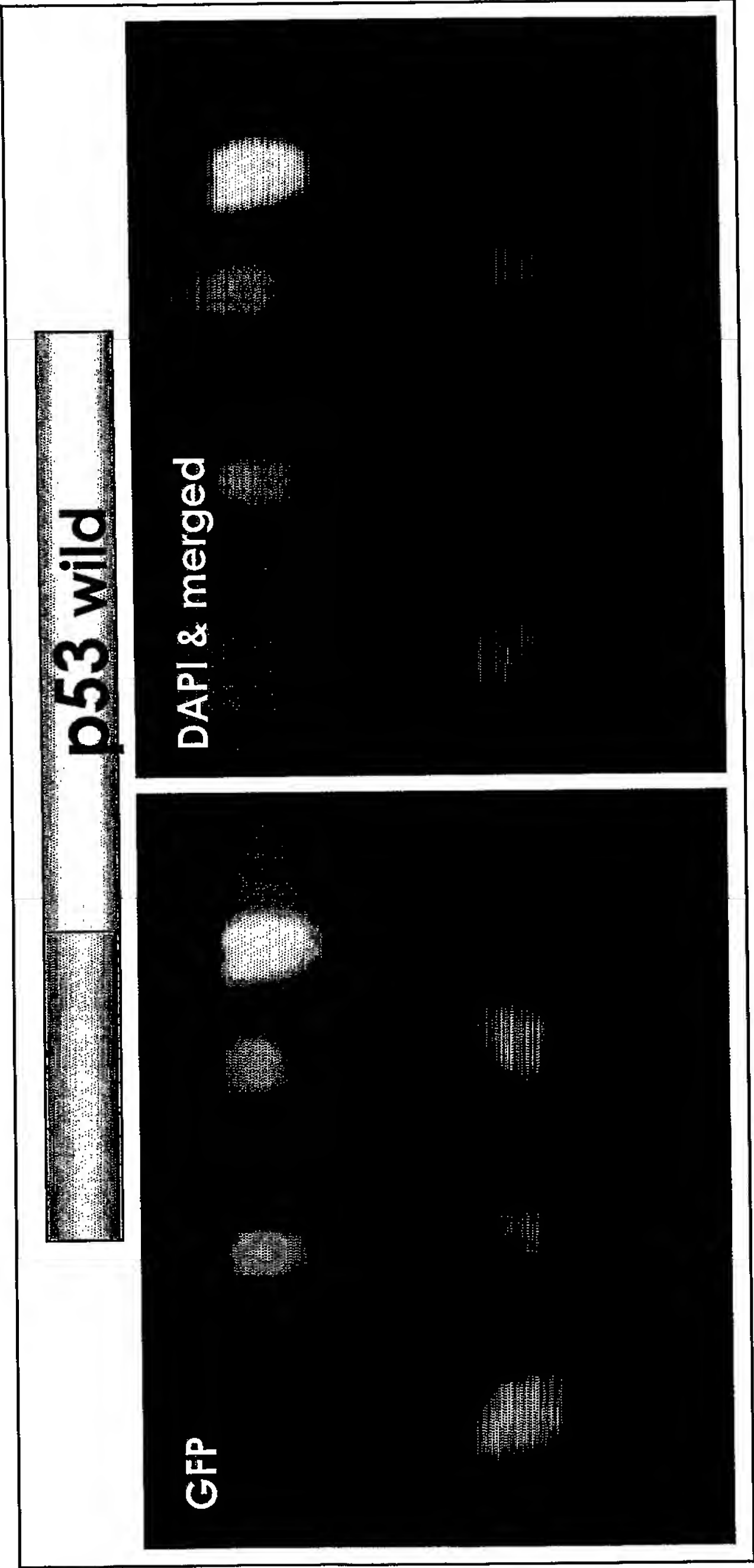


図 1 1

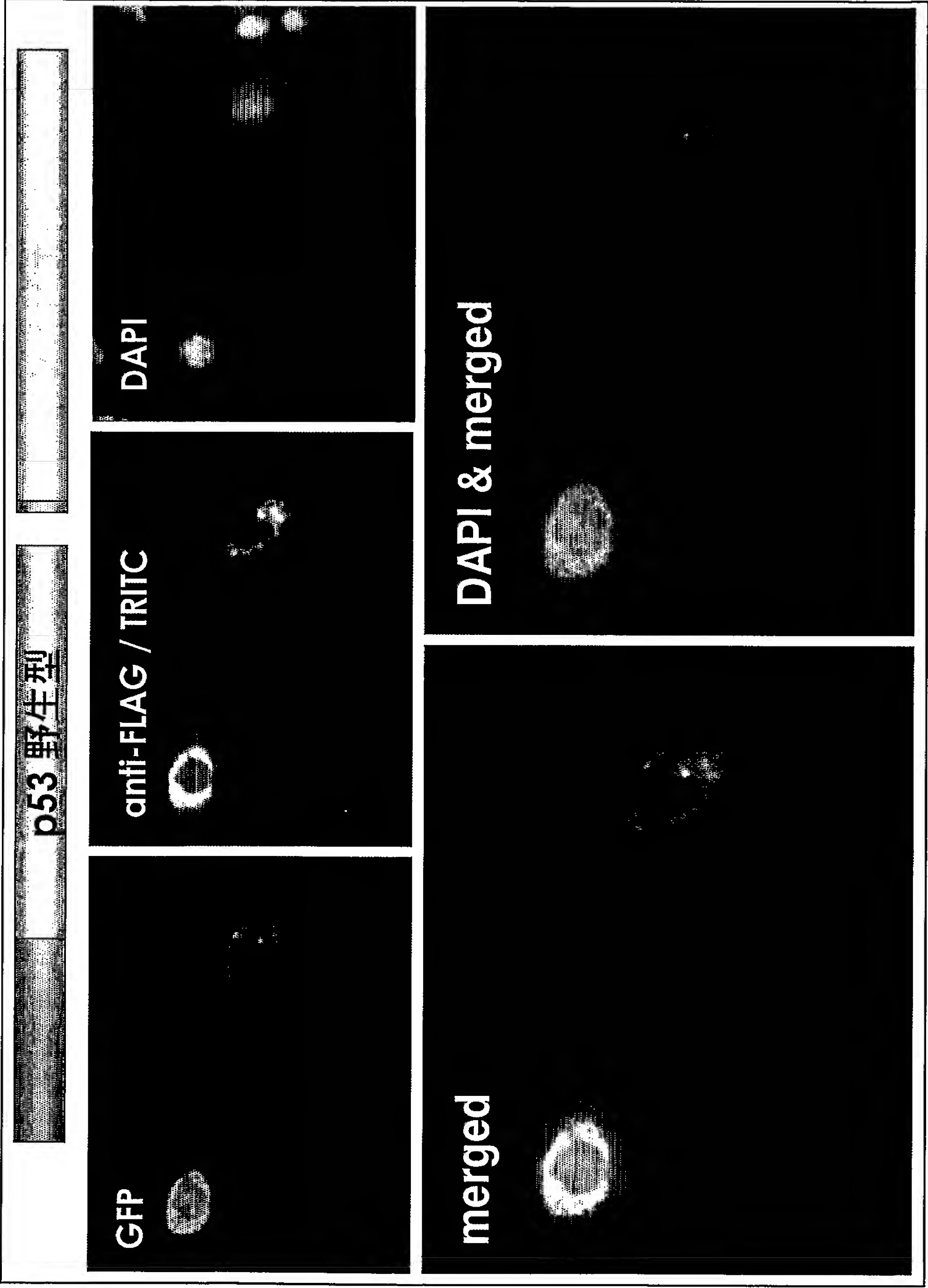
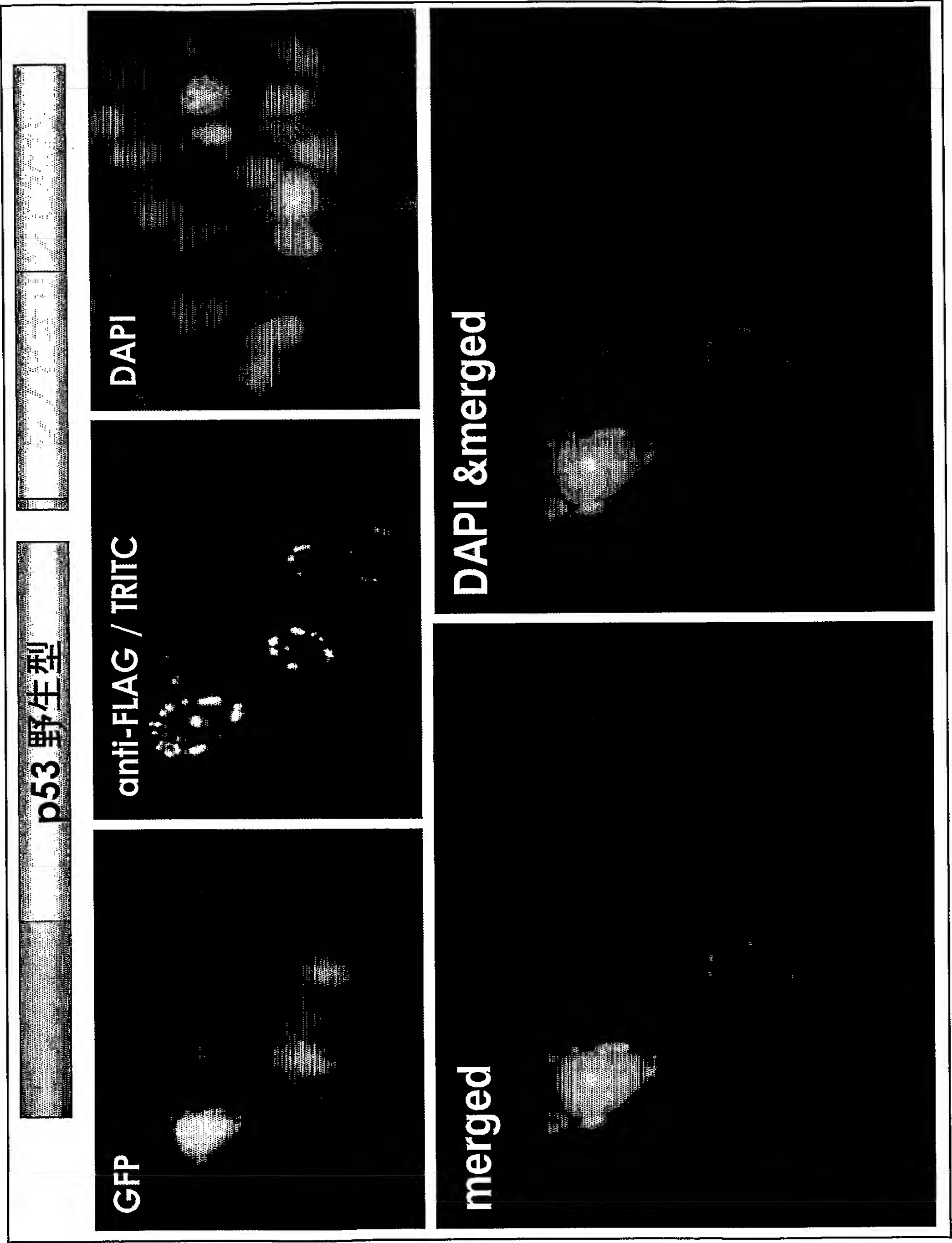


図 12



三十一

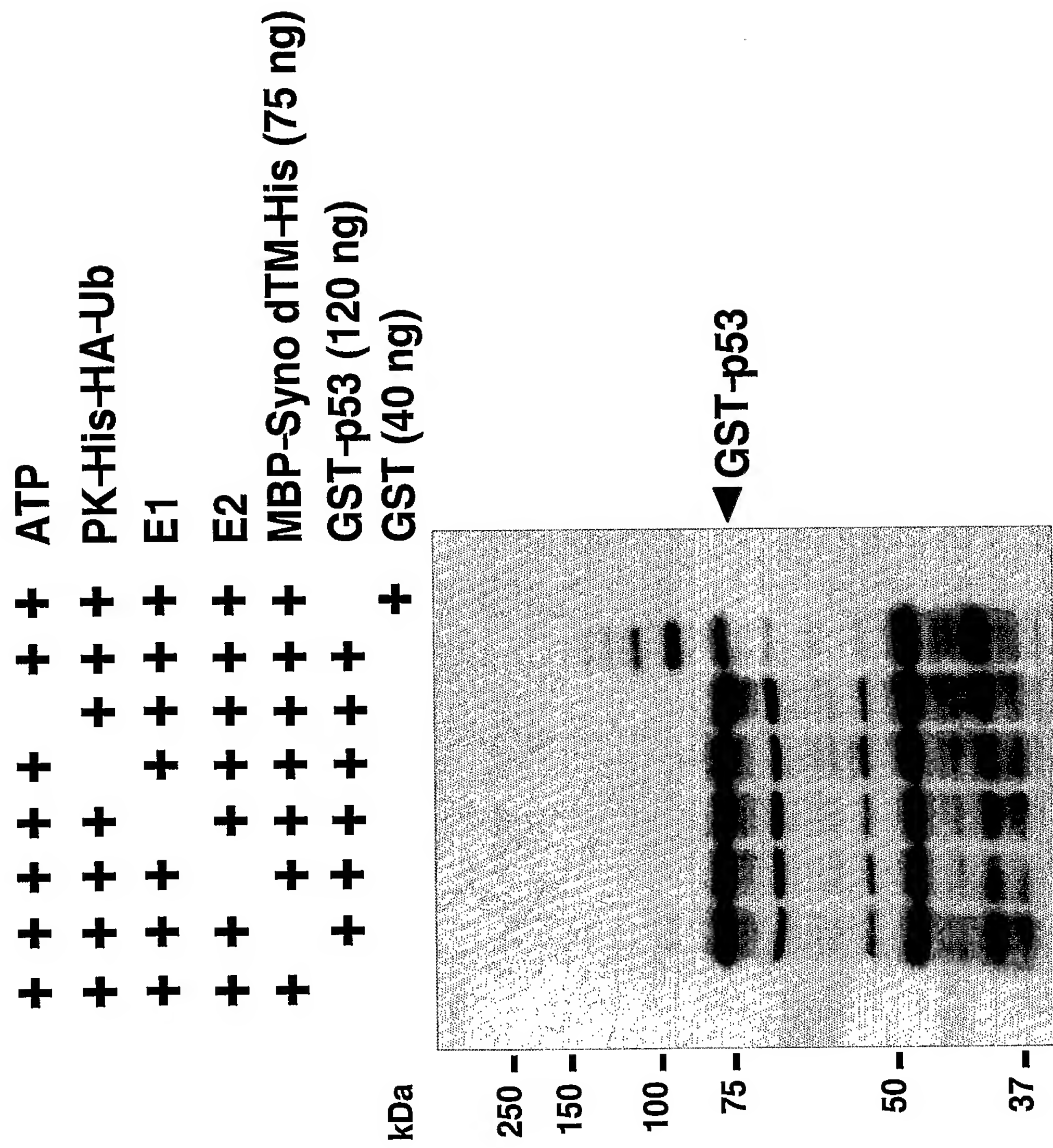


図14

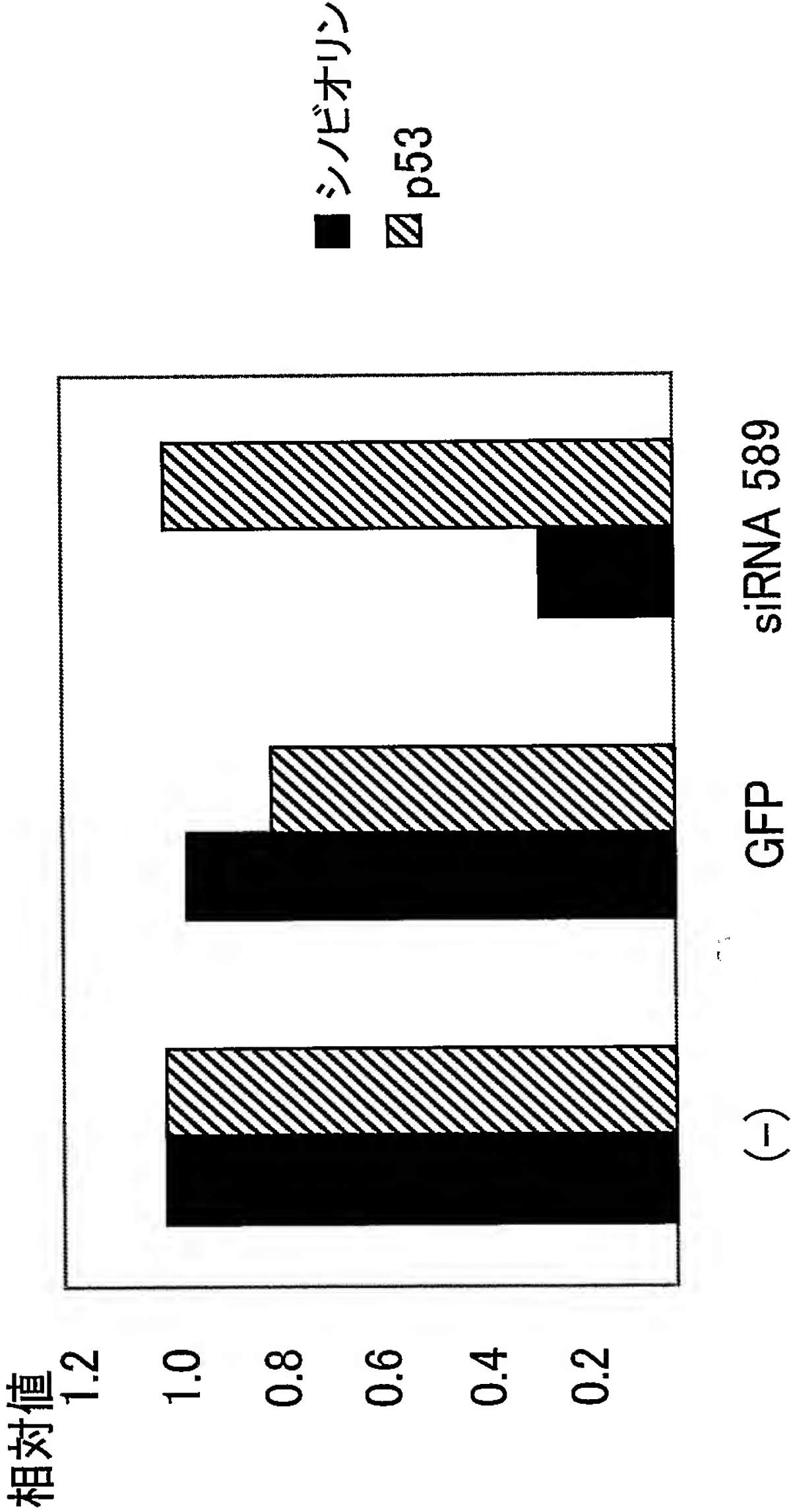


図15

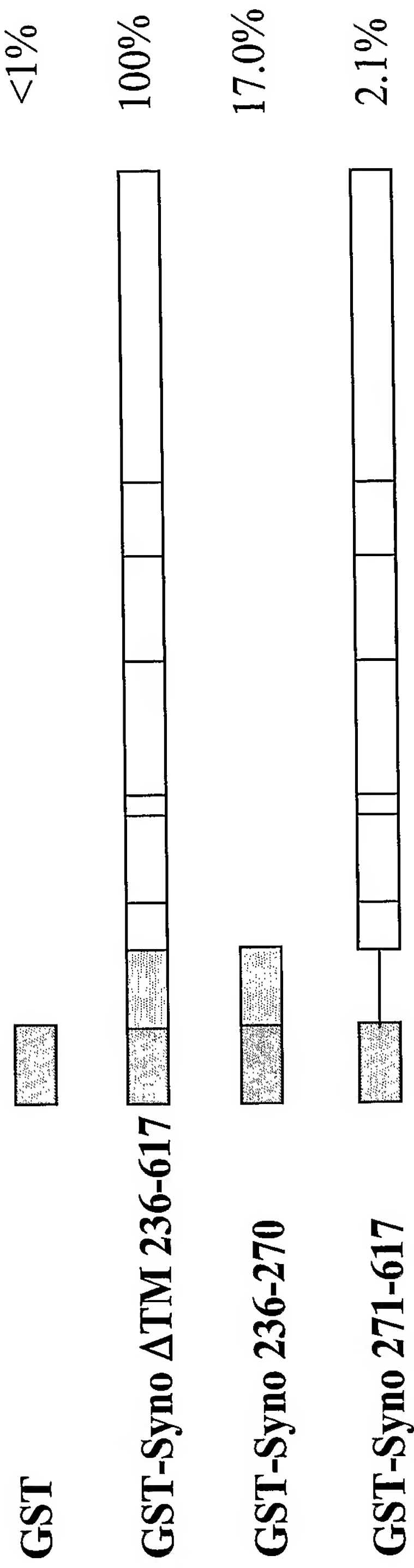
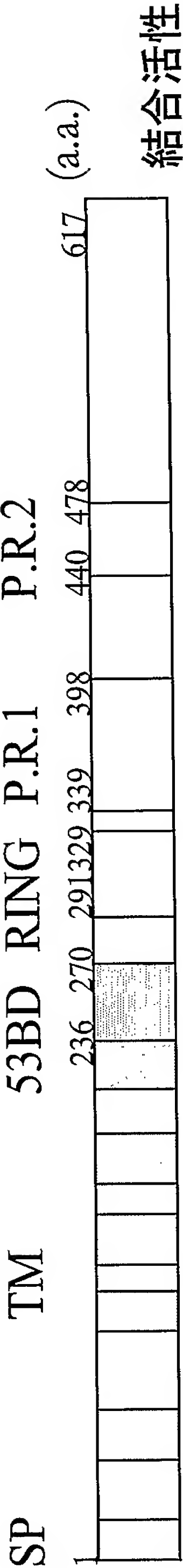
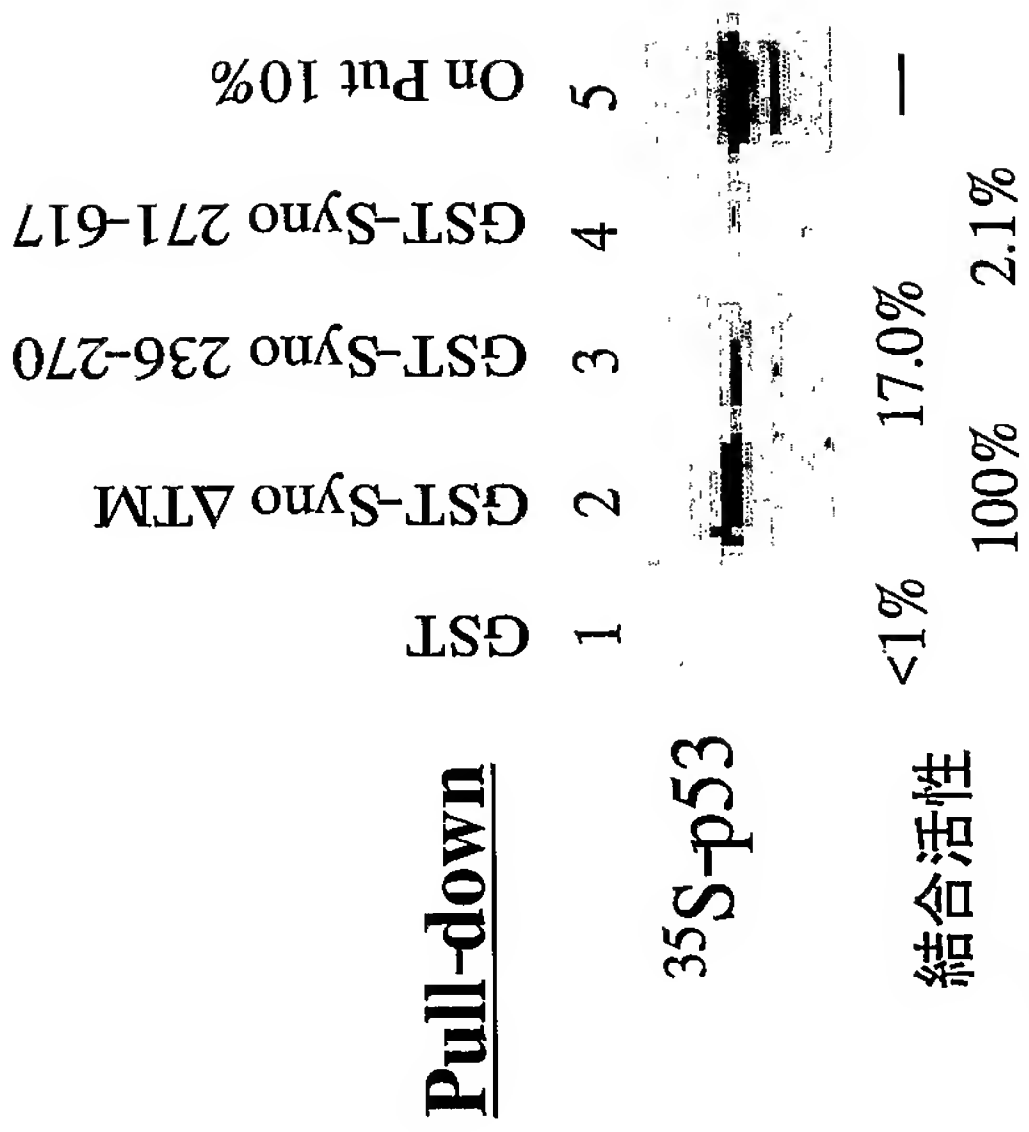
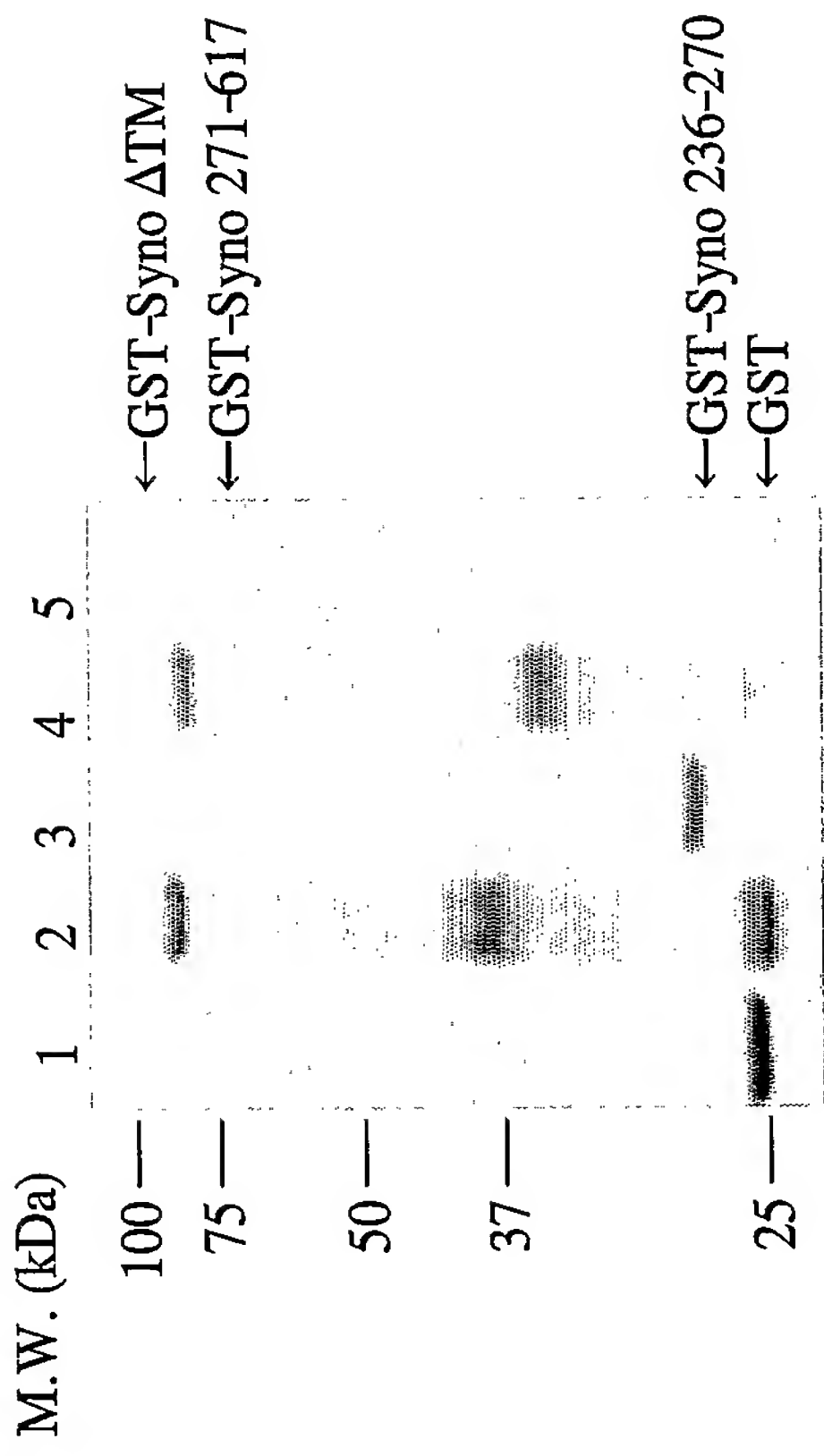


図 16



C.B.B.



SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> A method of inhibiting a cancer

<130> P04-232PCT

<150> JP2003-428300

<151> 2003-12-24

<160> 19

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (403).. (2256)

<223>

<400> 1

```
gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttggttg      60
ttgattgtag atatagggct ctcccttgca aggtaattag gctccttaaa ttacctgtaa      120
gattttcttg ccacagcatc cattctgggtt aggctgggtga tcttctgagt agtgatagat      180
tggttggtgg tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctgggtgttg gctacaatca      240
ggtagcgtct agagcagcat gggacagggtg ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag      300
tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga      360
```

gcgggctcgc ggcgctgggt tcctggcttc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414
Met Phe Arg Thr
1

gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct 462
Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala
5 10 15 20

cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510
His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu
25 30 35

acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558
Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val
40 45 50

ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606
Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln
55 60 65

ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654
Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala
70 75 80

gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702
Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser
85 90 95 100

ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750
Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe
105 110 115

cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798
His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn
120 125 130

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846
Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu

135	140	145	
ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg			894
Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu			
150	155	160	
acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc			942
Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile			
165	170	175	180
ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc			990
Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser			
185	190	195	
gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg			1038
Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met			
200	205	210	
ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg			1086
Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met			
215	220	225	
gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc			1134
Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala			
230	235	240	
atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca			1182
Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr			
245	250	255	260
gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat			1230
Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr			
265	270	275	
cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc			1278
Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile			
280	285	290	

atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac	1326
Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn	
295 300 305	
cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag	1374
His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln	
310 315 320	
acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tcg ctg cca gcg	1422
Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala	
325 330 335 340	
cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc	1470
Gln Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala	
345 350 355	
ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc	1518
Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn Phe Pro Gln Gly	
360 365 370	
ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg	1566
Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met	
375 380 385	
ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg	1614
Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val	
390 395 400	
gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca	1662
Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala	
405 410 415 420	
gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca	1710
Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr	
425 430 435	
gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct	1758
Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro	

440	445	450	
ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc			1806
Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro			
455	460	465	
ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg			1854
Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu			
470	475	480	
acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg			1902
Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu			
485	490	495	500
gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc			1950
Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala			
505	510	515	
gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg			1998
Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly			
520	525	530	
ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act			2046
Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr			
535	540	545	
aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc			2094
Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala			
550	555	560	
acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg			2142
Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg			
565	570	575	580
cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct gag gat gga			2190
Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly			
585	590	595	

gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag	2238
Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu	
600 605 610	
tct cct gtt gcc cac tga cactgccccca gccagcccc agcctctgct	2286
Ser Pro Val Ala His	
615	
cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct	2346
gcaccaggga gtagtacccc cagctctgag aaagaggcgg catcccctag gccaaagtga	2406
aagaggctgg ggttcccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc tcgggtcagt	2466
tccagccttc ctctccaact cttcagccct gtgttctgct ggggccatga aggcagaagg	2526
tttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccctttc caggagaagg ggctgccccct	2586
ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agctcccgtt	2646
cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc tggcccaccc	2706
ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct cttgtggtgg	2766
tggtgtgcc ccctatgcc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca cacaactcag	2826
ggaaaggaat gcctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc ctgccccgcc	2886
cctcccccca ggcccccttc ccttcagct tctcaagtga gactgacctg tctcaccag	2946
cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg accactgcaa	3006
tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt tagaattgga	3066
attacttcct tactagtgtc ttttggctta aattttgtct tttgaagttg aatgcttaat	3126
cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggctctt ccagttttaga aaaggctctg	3186

tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgcctgcccc tgtectttcc ccttggtttt 3246
 gtgttacaag agttgttga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa atattgtaca 3306
 aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa ctgcatata caaaaaaaaa 3366
 aaaaaaaaa 3374

<210> 2
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr
 20 25 30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile
 35 40 45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val
 50 55 60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg
 65 70 75 80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg
 85 90 95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe
100 105 110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu
115 120 125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu
130 135 140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr
145 150 155 160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe
165 170 175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr
180 185 190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys
195 200 205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val
210 215 220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe
225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys
245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met
260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp
275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg
290 295 300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe
305 310 315 320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala
325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly
340 345 350

Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn
355 360 365

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu
370 375 380

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser
385 390 395 400

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg
405 410 415

Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala
420 425 430

Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala
435 440 445

Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro
450 455 460

Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly
465 470 475 480

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu
485 490 495

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr
500 505 510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu
515 520 525

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu
530 535 540

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro
 545 550 555 560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro
 565 570 575

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met
 580 585 590

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu
 595 600 605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His
 610 615

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 aatgtctgca tcatctgccg aga

23

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 aagctgtgac agatgccatc atg

23

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
aaagctgtga cagatgcat cat

23

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
aagaaagctg tgacagatgc cat

23

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
aaggttctgc tgtacatggc ctt

23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
aacaaggctg tgtacatgct cta

23

<210> 9
<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aaatgtttcc actggctggc tga

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

aaggtgttct ttgggcaact gag

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aacatccaca cactgctgga cgc

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aacaccctgt atccagatgc cac

23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13
aaggtgcaca ccttcccact ctt

23

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
aatgtttcca ctggctggct gag

23

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
aagagactgc cctgcaacca cat

23

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
aacgttcctg gtacgccgtc aca

23

<210> 17
<211> 393
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met

145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide (DNA/RNA mixture)

<400> 18

gguguucuuu gggcaacugt t

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide (DNA/RNA mixture)

<400> 19

caguugccca aagaacacct t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 41/00, A61P35/00, 35/02, 35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 41/00, A61P35/00, 35/02, 35/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2001-502553 A (PHONE-POULENC RORER S.A.), 27 February, 2001 (27.02.01), Particularly, Claims; page 5, lines 3 to 12; examples & EP 941252 A1 & WO 1998/18825 A1	1, 6 2-5
X A	JP 2001-511815 A (Canji, Inc.), 14 August, 2001 (14.08.01), Particularly, Claims; page 11, line 3 to page 12, line 7; examples & EP 969720 A1 & WO 1998/35554 A1 & US 2003/0060434 A1	1, 6 2-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 March, 2005 (29.03.05)

Date of mailing of the international search report
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2002-531396 A (Pfizer Products Inc.), 24 September, 2002 (24.09.02), Particularly, Claims; page 28, line 11 to page 29, line 23; examples & EP 1137418 A1 & WO 2000/032175 A1 & US 2002/0048271 A1	1,6 2-5
X A	JP 10-512559 A (RHONE-POULENC RORER S.A.), 02 December, 1998 (02.12.98), Particularly, Claims; page 12, line 17 to page 14, line 5; examples & EP 800399 A1 & WO 1996/22101 A1 & US 2001/0021395 A1	1,6 2-5
X A	JP 10-503361 A (Board of Regents, the University of Texas System), 31 March, 1998 (31.03.98), Particularly, Claims; page 7, line 19 to page 9, line 3; examples & JP 10-503476 A & EP 725791 A1 & EP 575518 A1 & EP 760675 A1 & EP 1157702 A1 & WO 1995/015680 A1 & US 6017524 A & US 5747469 A & US 6069134 A & US 6143290 A	1,6 2-5
A	WO 2002/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), (Family: none)	1-6
A	WO 2003/008573 A2 (MILNER, Anne, Josephine), 30 January, 2003 (30.01.03), & JP 2004-535813 A & EP 1432799 A2 & US 2004/235171 A1	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019800

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7-22

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7 to 22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019800

<Subject of search>

Claims 1 and 2 relate to medicinal compositions containing compounds defined by desired properties "a substance promoting the activity of the cancer suppressor gene p53 or the protein p53" and "a substance inhibiting the expression and/or function of synoviolin". Although claims 1 and 2 involve any compounds having these properties, it is recognized that only small parts of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scopes of the compounds having the properties "a substance promoting the activity of the cancer suppressor gene p53 or the protein p53" and "a substance inhibiting the expression and/or function of synoviolin" cannot be specified. Thus, claims 1 and 2 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made exclusively on the relationship between the effect of promoting the activity of the cancer suppressor gene p53 or the protein p53 and cancer treatment and medicinal compositions efficacious in treating cancer which contains siRNA or shRNA for genes encoding synoviolin as presented in detail in the description and specified in claims 3 to 5.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 41/00, A61P35/00, 35/02, 35/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7088, 41/00, A61P35/00, 35/02, 35/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2001-502553 A (ローヌ・プーラン・ロレ・エ ス・アー), 2001.02.27, 特に、特許請求の範囲、第5 頁第3~12行及び実施例 & EP 941252 A1 & WO 1998/18825 A1	1, 6 2-5
X A	JP 2001-511815 A (カンジ, インコーポレイテッ ド), 2001.08.14, 特に、特許請求の範囲、第11頁第 3行~第12頁第7行及び実施例 & EP 969720 A1 & WO 1998/35554 A1 & US 2003/ 0060434 A1	1, 6 2-5

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.2005

国際調査報告の発送日

12.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

4C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 2002-531396 A (ファイザー・プロダクツ・インク), 2002.09.24, 特に、特許請求の範囲、第28頁第11行~第29頁第23行及び実施例 & EP 1137418 A1 & WO 2000/032175 A1 & US 2002/0048271 A1	1, 6 2-5
X A	JP 10-512559 A (ローヌープーラン・ロレ・エス・アー), 1998.12.02, 特に、特許請求の範囲、第12頁第17行~第14頁第5行及び実施例 & EP 800399 A1 & WO 1996/22101 A1 & US 2001/0021395 A1	1, 6 2-5
X A	JP 10-503361 A (ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニヴァーシティ・オブ・テキサス・システム), 1998.03.31, 特に、特許請求の範囲、第7頁第19行~第9頁第3行及び実施例 & JP 10-503476 A & EP 725791 A1 & EP 575518 A1 & EP 760675 A1 & EP 1157702 A1 & WO 1995/015680 A1 & US 6017524 A & US 5747469 A & US 6069134 A & US 6143290 A	1, 6 2-5
A	WO 2002/052007 A1 (株式会社ロコモジェン), 2002.07.04 (ファミリーなし)	1-6
A	WO 2003/008573 A2 (ミルナー, アン, ジョセフ・イズ), 2003.01.30 & JP 2004-535813 A & EP 1432799 A2 & US 2004/235171 A1	1-6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲7-22は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1, 2は、「p53癌抑制遺伝子又はp53タンパク質の活性を促進する物質」、「シノビオリンの発現及び／又は機能阻害物質」という所望の性質により定義された化合物を含む医薬組成物に関するものである。そして、請求の範囲1, 2は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「p53癌抑制遺伝子又はp53タンパク質の活性を促進する物質」、「シノビオリンの発現及び／又は機能阻害物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1, 2は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、p53癌抑制遺伝子又はp53タンパク質の活性を促進する作用と癌の治療との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲3-5に特定されているシノビオリンをコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNAを含有する癌等の治療に有効な医薬組成物について行った。